





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی
استان قزوین

دانشکده پزشکی

گروه میکروبیولوژی - ایمونولوژی

پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد

عنوان:

شناسایی ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزای مولد

متالوبتالاکتامازهای IMP، VIM و SPM

به دو روش فنوتیپی و مولکولی (PCR)

استاد راهنما:

دکتر امیر پیمانی

نگارنده:

مهدی محمدی

شماره ثبت: ۳۹

سال تحصیلی: ۹۴-۱۳۹۳

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم.

با تشکر از؛ اساتید بزرگوارم،

جناب آقای دکتر امیر پیمانی

جناب آقای دکتر تقی ناصرپور

سرکار خانم دکتر معصومه اصلانی مهر

که بدون کمک ها و پیگیری هایشان تهیه این اثر به هیچ عنوان امکان پذیر نبود.

تقدیم به پدر بزرگوار و مادر مهربانم

پدرم، اولین استادم که همواره چتر محبتش بر سرم است
بزرگواری که الفبای زندگی را از او آموختم.

مادرم، بلند تکیه گاهم، که دامن پرمهرش یگانه پناهم است
مهربانی که عشق ورزیدن را از او آموختم.

چکیده

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) به عنوان یکی از مهمترین پاتوژن های فرصت طلب ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی مطرح است. علیرغم پیشرفت های زیاد در سیستم های مراقبت بیمارستانی و معرفی طیف گسترده ای از عوامل ضد میکروبی، این باکتری همچنان از عوامل شایع ایجاد کننده عفونت در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان می باشد. با توجه به مقاومت روز افزون این باکتری به دارو های ضد باکتریایی و به خصوص نسبت به ترکیبات بتالاکتام اهمیت مقاومت آن دو چندان می شود. هدف از این مطالعه تعیین ژن های متالوبتالاکتاماز های *IMP*، *VIM* و *SPM* در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان های شهر های تهران و قزوین بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی مقطعی، ۳۵۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نمونه های بالینی مختلف از بیمارستان های شهر های تهران و قزوین طی دو سال اخیر، سال های ۱۳۹۱-۱۳۹۳ جمع آوری گردید. پس از تایید ایزوله ها با تست های بیوشیمیایی، حساسیت آنتی بیوتیکی آنها با روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Baur) طبق توصیه CLSI نسبت به ۱۸ آنتی بیوتیک تعیین گردید. برای بررسی وجود MBLs در سویه های ایزوله شده، از روش دیسک ترکیبی (Combined Disk) استفاده شد و حضور ژن های، *blaIMP-1*، *blaIMP-2*، *blaVIM-1*، *blaVIM-2* و *blaSPM* با استفاده از روش PCR بررسی شد.

نتایج: در این مطالعه به ترتیب بیشترین درصد مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک سفپودوکسیم با ۹۸/۶٪ و کمترین درصد مقاومت مربوط به پلی میکسین با ۱/۷٪ بود. ۱۳۸ (۳۴/۹٪) ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کارباپنم بودند. از ۵۸ (۴۲/۰۲٪) ایزوله سودوموناس آئروژینوزای مولد متالوبتالاکتاماز، ۱۷ ایزوله (۲۹/۳٪) حامل ژن *blaIMP-1*، ۱۳ ایزوله (۱۹/۷٪) حامل ژن *blaVIM-1* به تنهایی و ۳ (۵/۲٪) ایزوله به طور همزمان حامل هر دو ژن *blaIMP-1* و *blaVIM-1* بودند.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان دهنده ی افزایش روند مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا به سبب تولید آنزیم متالوبتالاکتاماز می باشد. لذا با توجه به اهمیت بالینی این سویه های مقاوم در بیمارستان های مورد مطالعه، شناسایی سریع ارگانیزم های مولد این آنزیم ها و به کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت جهت جلوگیری از انتشار بیشتر این ارگانیزم ها ضروری است.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، متالوبتالاکتاماز، مقاومت آنتی بیوتیکی

فهرست مطالب

فصل اول:	۱۵
۱-۱- اهمیت موضوع	۱۶
۲-۱- مقدمه	۱۸
۱-۲-۱- خانواده‌ی سودوموناداسه	۱۸
۲-۲-۱- تاکسونومی سودوموناس آئروژینوزا	۱۸
جدول ۱-۲- تاکسونومی سودوموناس آئروژینوزا	۱۸
۳-۲-۱- تاریخچه‌ی سودوموناس آئروژینوزا	۱۹
۴-۲-۱- نامگذاری سودوموناس آئروژینوزا	۲۰
۵-۲-۱- مورفولوژی و مشخصات	۲۰
۱-۵-۲-۱- ارگانیسم‌های تیپیک	۲۰
۲-۵-۲-۱- کشت	۲۱
۳-۵-۲-۱- خصوصیات رشد	۲۱
۶-۲-۱- ژنتیک	۲۱
۷-۲-۱- ساختمان آنتیژنیک	۲۲
۸-۲-۱- متابولیسم	۲۲
۹-۲-۱- خصوصیات بیوشیمیایی	۲۳
۱۰-۲-۱- بیوفیلم	۲۳
۱۱-۲-۱- کوئوروم سنسینگ	۲۴
۱۲-۲-۱- فاکتورهای باکتریایی درگیر در بیماریزایی	۲۵
۱-۱۲-۲-۱- فاکتورهای بیماریزای سطح سلولی	۲۵
۱-۱۲-۲-۱- فلاژل	۲۵

۲۶.....	۱-۲-۱۲-۲-۱- پیلی
۲۶.....	۱-۲-۱۲-۳-۱- لیپوپلیساکارید
۲۸.....	۱-۲-۱۲-۲- فاکتورهای بیماریزای ترشحاتی
۲۸.....	۱-۲-۱۲-۲- پیووردين
۲۹.....	۱-۲-۱۲-۳- آلکالین پروتئاز
۲۹.....	۱-۲-۱۲-۴- پروتئاز IV
۲۹.....	۱-۲-۱۲-۵- الاستاز
۳۰.....	۱-۲-۱۲-۶- فسفولیپاز C
۳۰.....	۱-۲-۱۲-۷- رامنو لیپیدها
۳۱.....	۱-۲-۱۲-۸- اگزوتوکسین A
۳۱.....	۱-۲-۱۲-۳- سیستم ترشحاتی تیپ III
۳۲.....	۱-۲-۱۳- بیماریزایی سودوموناس آئروژینوزا
۳۳.....	۱-۲-۱۴- بیماری‌های سودوموناس آئروژینوزا
۳۳.....	۱-۲-۱۴-۱- باکتری می
۳۴.....	۱-۲-۱۴-۲- عفونت‌های دستگاه تنفسی
۳۴.....	۱-۲-۱۴-۳- عفونت مزمن دستگاه تنفس
۳۵.....	۱-۲-۱۴-۴- عفونت استخوان و مفاصل
۳۵.....	۱-۲-۱۴-۵- عفونت دستگاه ادراری
۳۶.....	۱-۲-۱۴-۶- سوختگی‌ها
۳۶.....	۱-۲-۱۴-۷- زخم‌ها
۳۶.....	۱-۲-۱۴-۸- پوست و چشم
۳۷.....	۱-۲-۱۴-۹- سیستمیک فیبروزیس

۳۸.....	۱-۲-۱۵- اپیدمیولوژی
۳۹.....	۱-۲-۱۶- تشخیص
۴۰.....	۱-۲-۱۷- واکسن و ایمونوتراپی
۴۱.....	۱-۲-۱۹- آنتی بیوتیک ها
۴۲.....	۱-۲-۱۹- آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتام
۴۲.....	۱-۲-۱۹- آمینو گلیکوزیدها
۴۳.....	۱-۲-۱۹- آنتی بیوتیک های بتالاکتام
۴۳.....	۱-۲-۱۹- پنی سیلین ها
۴۴.....	۱-۲-۱۹- سفالوسپورین ها
۴۴.....	۱-۲-۱۹- کارباپنم ها
۴۵.....	۱-۲-۱۹- منوباکتام ها
۴۵.....	۱-۲-۲۰- مقاومت آنتی بیوتیکی
۴۶.....	۱-۲-۲۰- چگونگی ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی
۴۷.....	۱-۲-۲۰- منشاء مقاومت دارویی
۴۷.....	۱-۲-۲۰- منشاء ژنتیکی
۴۷.....	۱-۲-۲۰- مقاومت کروموزومی
۴۷.....	۱-۲-۲۰- مقاومت خارج کروموزومی
۴۸.....	۱-۲-۲۰- منشاء غیر ژنتیکی
۴۸.....	۱-۲-۲۱- بتالاکتامازها
۴۸.....	۱-۲-۲۱- طبقه بندی بتالاکتامازها
۵۰.....	۱-۲-۲۱- متالوبتالاکتامازها
۵۱.....	۱-۲-۲۱- انواع ژن های قابل انتقال متالوبتالاکتامازها

۵۵.....	۱-۲-۲۱-۴-۱- شناسایی فنوتیپی متالوبتالاکتامازها
۵۶.....	۱-۲-۲۱-۴-۱- تست‌های غربالگری:
۵۶.....	۱-۲-۲۱-۴-۲- تست‌های تاییدی:
۵۸.....	۱-۲-۲۱-۵- درمان متالوبتالاکتامازها
۵۹.....	۱-۲-۲۱-۶- اپیدمیولوژی متالوبتالاکتامازها
۶۰.....	فصل دوم:
۶۱.....	۲-۲- مروری بر متون
۶۵.....	فصل سوم:
۶۶.....	۳-۱- اهداف پژوهش
۶۶.....	۳-۱-۲- اهداف جزئی طرح
۶۶.....	۳-۱-۳- تعریف واژه‌ها
۶۷.....	۳-۱-۴- محدودیت‌های طرح
۶۷.....	۳-۱-۵- هدف از تحقیق حاضر
۶۷.....	۳-۲- نوع پژوهش
۶۷.....	۳-۳- جامعه پژوهش
۶۸.....	۳-۴- واحد پژوهش
۶۸.....	۳-۵- متغیرها
۶۸.....	۳-۶- روش انتخاب نمونه
۶۸.....	۳-۶- روش اجرای پژوهش
۶۸.....	۳-۶-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها
۶۹.....	۳-۶-۲- شناسایی و تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده
۶۹.....	۳-۶-۳- محیط کشت‌های مورد نیاز

۶۹.....	۳-۶-۱- محیط مک کانکی آگار
۶۹.....	۳-۶-۲- محیط OF
۷۰.....	۳-۶-۳- محیط TSI
۷۰.....	۳-۶-۴- محیط SIM
۷۰.....	۳-۶-۴- نگهداری ایزوله‌ها
۷۱.....	۳-۶-۵- بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش Disk Diffusion
۷۱.....	۳-۶-۵-۱- مواد و وسایل مورد نیاز تست آنتی بیوگرام
۷۲.....	۳-۶-۵-۲- تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند
۷۲.....	۳-۶-۵-۳- کنترل کیفی دیسک‌ها
۷۲.....	۳-۶-۵-۴- روش کار تست آنتی بیوگرام
۷۳.....	۳-۶-۶- آزمایش دیسک ترکیبی جهت تشخیص فنوتیپی متالوبتالاکتامازها
۷۳.....	۳-۶-۶-۱- وسایل و مواد لازم
۷۳.....	۳-۶-۶-۲- روش کار
۷۴.....	۳-۶-۶-۳- تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) با روش E- test
۷۴.....	۳-۶-۶-۴- آماده کردن سوسپانسیون میکروبی و تلقیح آن
۷۵.....	۳-۶-۷- واکنش زنجیرهای پلیمرز
۷۵.....	۳-۶-۷-۱- استخراج DNA
۷۶.....	۳-۶-۷-۲- ارزیابی کمی DNA استخراج شده
۷۷.....	۳-۶-۷-۳- مواد مورد نیاز جهت انجام PCR
۷۷.....	۳-۶-۷-۴- پروسه انجام واکنش PCR
۷۸.....	۳-۶-۸- تکثیر آنزیم‌های متالوبتالاکتامازی IMP, VIM و SPM
۷۸.....	۳-۶-۸-۱- پرایمرهای مورد استفاده

۷۹.....	۳-۸-۲- حجم و غلظت مواد PCR جهت تکثیر آنزیم‌های متالوبتالاکتامازی IMP, SPM و VIM
۸۰.....	۳-۸-۳- برنامه دمایی جهت تکثیر ژنهای bla_{IMP} , bla_{SPM} و bla_{VIM}
۸۰.....	۳-۹-۶- آشکارسازی و الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز
۸۰.....	۳-۹-۱- مواد و وسایل مورد نیاز برای الکتروفورز
۸۱.....	۳-۹-۲- محلول رنگ آمیزی
۸۱.....	۳-۹-۳- انجام الکتروفورز و روش تهیه ژل
۸۳.....	فصل چهارم:
۸۴.....	۴-۱- جمع آوری نمونه‌ها
۸۴.....	۴-۲- توزیع فراوانی ایزوله‌های جمع‌آوری شده بر اساس جنسیت و نوع نمونه بالینی
۸۶.....	۴-۳- تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا
۸۶.....	۴-۴- تعیین حساسیت آنتیبیوتیکی
۸۸.....	۴-۱-۱- نتایج آزمون تاییدی (Combined Disk)
۹۱.....	۴-۵- آزمایش PCR برای تشخیص آنزیمهای متالوبتالاکتاماز IMP, VIM و SPM
۹۶.....	فصل پنجم:
۹۷.....	۵-۱- بحث
۱۰۴.....	۵-۲- نتیجه گیری
۱۰۴.....	پیشنهادهات
۱۰۵.....	References

فهرست جداول

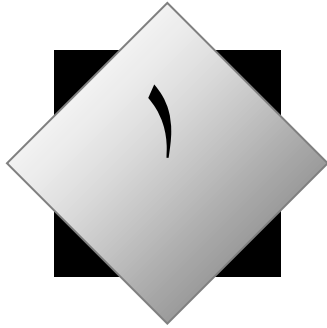
جدول ۱-۲ تاکسونومی سودوموناس آئروژینوزا	۱۸
جدول ۱-۳- پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه	۷۸
جدول ۲-۳- حجم و غلظت نهایی مواد PCR برای ژن‌های <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{SPM}</i> و <i>bla_{VIM}</i>	۷۹
جدول ۳-۳- برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i> و <i>bla_{SPM}</i>	۸۰
جدول ۱-۴- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا	۸۷
جدول ۲-۴- مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های مولد و غیر مولد MBL	۸۹
جدول ۳-۴- توزیع فراوانی نمونه‌های بالینی مختلف حامل ژن‌های متالو بتالاکتامازی	۹۲
جدول ۴-۴- مشخصات کامل ایزوله‌های مولد متالوبتالاکتاماز های IMP-1 و VIM-1	۹۴

فهرست نمودارها

- نمودار ۴-۱- توزیع فراوانی نسبی ایزوله‌های جمع آوری شده بر اساس جنسیت ۸۵
- نمودار ۴-۲- توزیع فراوانی نمونه‌های بالینی مختلف به کار رفته در این مطالعه ۸۵
- نمودار ۴-۳- نتایج حداقل غلظت مهاری (MIC) با روش E- test در ایزوله‌های دارای ژن متالوبتا لاکتاماز ۹۰

فهرست شکل‌ها

- شکل ۴-۱- نمایشی از نتیجه آزمون دیسک دیفیوژن در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا ۸۸
- شکل ۴-۲- تست تاییدی فنوتیپی جهت شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد MBL ۹۰
- شکل ۴-۳- الکتروفورز محصولات PCR حامل ژن *bla*_{IMP-1} بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ۹۲
- شکل ۴-۴- الکتروفورز محصول PCR ژن *bla*_{VIM-1} بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ۹۳
- شکل ۴-۵- الکتروفورز PCR ژن *bla*_{VIM-2} و *bla*_{IMP-2} بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ۹۳



فصل اول:

کلیات

- اهمیت موضوع
- مقدمه

۱-۱- اهمیت موضوع

بررسی سیر تحول پیکار با میکروارگانیسم های عفونت‌زا در سده اخیر، از یک سو، بیانگر موفقیت انسان در کنترل عفونت‌ها از طریق تولید آنتی‌بیوتیک های نوین است و از سوی دیگر نشان دهنده تلاش بی‌وقفه طبیعت در بقاء این مخلوقات میکروسکوپی از راه ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک ها می باشد. کشف داروهای ضد میکروبی بدون شک یکی از مهمترین پیشرفت‌های بشر در زمینه سلامت در طول تاریخ است که تاکنون جان میلیون‌ها نفر را نجات داده است. مقاومت داروهای ضد میکروبی اگرچه مسأله جدیدی نیست، اما هر لحظه رو به خطرناک شدن پیش می‌رود. مکانیسم‌های مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، مختلف و متفاوت بوده، یکی از مهمترین آنها تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز توسط باکتری‌هاست که عامل مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است. این آنزیم‌ها از طریق هیدرولیز هسته مرکزی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باعث از بین رفتن اثرات آنها و غیر فعال شدن آنها می‌شوند. متالوبتالاکتامازها، از جمله آنزیم‌های بتالاکتامازی هستند که توسط برخی باکتری‌های مقاوم ترشح شده و باعث مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود. این آنزیم‌ها بطور وسیعی در میان باکتری‌ها توزیع شده‌اند و نقش اصلی را در مقاومت ذاتی و اکتسابی باکتری‌ها ایفا می‌کنند. متالوبتالاکتامازها طیف سوبسترایی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز منوباکتام‌ها هستند. این آنزیم‌ها داخل اینتگرون قرار گرفته و می‌توانند در پلاسمید یا کروموزوم ادغام شوند، لذا قابلیت انتقال به سایر سویه‌های سودوموناس و باکتری‌های دیگر از جمله انترو باکتریاسه‌ها را دارند. اما بطور برجسته و شاخص ژن این آنزیم در سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* به وفور مشاهده می‌شود. آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز، اولین بار سال ۱۹۹۱ در ژاپن از باکتری سودوموناس *آئروژینوزا* گزارش شد. پس از آن از نواحی مختلف دنیا شامل آسیا، اروپا، استرالیا، امریکای شمالی و جنوبی نیز گزارش شده است. در حال حاضر سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* تولید کننده متالوبتالاکتامازها از سراسر دنیا گزارش می‌شود. الگوهای متفاوتی برای طبقه‌بندی آنزیم‌های

بتالاکتاماز وجود دارد. یکی از این روش‌ها که بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد به وسیله Bush- Jacoby- Medeiros ابداع گردیده است که بر اساس نوع سوبستراها، ممانعت کنندگی و خصوصیات فیزیکی مانند وزن ملکولی و نقطه ایزوالکتریک بنا شده است. متالوبتالاکتامازها از جمله آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که در گروه ۳ از طبقه‌بندی Bush و کلاس B از طبقه‌بندی Ambler قرار گرفته‌اند، و به کاتیون‌های دو ظرفیتی (مانند فلز روی) به عنوان کوفاکتور برای فعالیت آنزیمی خود نیاز دارند. امروزه شاهد روز افزون مقاومت‌های باکتریایی و عفونت‌های ناشی از آنها در جهان هستیم. این مسئله یکی از بحران‌های موجود در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌هاست. انتقال و انتشار سریع ارگاناسم‌هایی که قادر به تولید آنزیم‌های مذکورند، باعث بالا رفتن میزان عفونت‌های بیمارستانی مربوط در سراسر دنیا شده است. از جمله باکتری‌هایی که در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی دخیل است، می‌توان به سودوموناس آئروژینوزا اشاره کرد. سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد و در افرادی که دچار ضعف سیستم ایمنی هستند سبب بیماری‌هایی مانند عفونت گوش میانی^۱، پوستی (به خصوص افراد دچار سوختگی)، باکتریایی، عفونت مغز استخوان و مفاصل، مننژیت و آبسه‌های مغزی، کراتیت، انتروکولیت، تب شانگهای (مشابه حصبه)، اندوکاردیت، پنومونی و عفونت مجاری ادراری می‌گردد. ریشه کن نمودن عفونت‌های ایجاد شده توسط سودوموناس آئروژینوزا به دلیل نیازهای تغذیه‌ای کم، مقاومت به محدوده دمایی وسیع و همچنین مقاومت نسبت به مواد ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها، دشوار است.

1-Swimmers ear

۲-۱- مقدمه

۱-۲-۱- خانواده‌ی سودوموناداسه

خانواده‌ی سودوموناداسه شامل دسته بزرگی از باسیل‌های گرم منفی یا باسیل‌های غیرتخمیر کننده‌ی هوازی اجباری هستند که اکسیداز مثبت و متحرک بوده و قادر به رشد در محیط‌های بسیار ساده است. از بین باسیل‌های جدا شده در نمونه‌های بالینی، ۱۲ تا ۱۶٪ در این خانواده قرار می‌گیرد. خانواده‌ی سودوموناداسه براساس شباهت rRNA/DNA و خصوصیات رایج کشت در پنج گروه طبقه‌بندی می‌شوند اما تنها سه گروه (I، II و V) شامل پاتوژن‌های انسانی هستند. گروه‌های I و II، از اعضاء جنس سودوموناس (سودومونادها) تشکیل شده و گروه V شامل یک گروه منفرد به نام *استنوتروفوموناس (گزانتوموناس) مالتوفیلیا* می‌باشد (۳-۱). سودوموناس *آئروژینوزا* عمده‌ترین عامل بیماری‌زای انسانی در این گروه محسوب می‌شود، سایر سودوموناس‌ها به ندرت بیماری ایجاد می‌کنند (۳).

۱-۲-۲- تاکسونومی سودوموناس آئروژینوزا

طبقه‌بندی سودوموناس *آئروژینوزا* براساس شباهت rRNA/DNA و خصوصیات رایج کشت به صورت زیر می‌باشد (۳).

جدول ۱-۲ تاکسونومی سودوموناس آئروژینوزا

Kingdom •Bacteria	Phylum •Proteobacteria	Class •Gamma Proteobacteria
Order •Pseudomonadales	Family •Pseudomonadaceae	Genus •Pseudomonas
Species •Pseudomonas aeruginosa		

۱-۲-۳- تاریخچه‌ی سودوموناس آئروژینوزا

دوگت^۱ قبل از توسعه و گسترش میکروبیولوژی پزشکی مدرن مستندات مبنی بر این که سودوموناس آئروژینوزا^۲ منجر به آسیب‌های جدی و عفونت‌های جراحی می‌گردد ارائه کرد. سال ۱۸۵۰، سدیلت^۳ یک جراح نظامی فرانسوی، تشکیل چرک‌های آبی رنگ را در زخم سربازان زخمی مشاهده کرد. سال ۱۸۶۰، فوردوس^۴ موفق به استخراج رنگ‌دانه از این باکتری شد و ماده‌ی کریستالین به دست آمده از آن را پیوسیانین نامید. ۱۸۶۲، لوک^۵ ابتدا ارتباط ارگانیسیم میله‌ای شکل با پیگمان را بررسی کرد، در سال ۱۸۸۲ گسارد^۶ ارگانیسیم مسئول این پیگمانتاسیون را توصیف کرد و نامش را باسیلوس پیوسیانوس گذاشت (۴). ۱۹۲۵، اوسلر^۷ اظهار داشت که ارگانیسیم اغلب مهاجم فرصت طلب یا ثانویه بافت‌های آسیب دیده بوده و باعث ایجاد عفونت اولیه در بافت‌های سالم می‌گردد. در دهه ۱۹۶۰، سودوموناس آئروژینوزا^۸ به دلیل عفونت‌زایی در افراد با اختلال ایمنی و بیماران دچار سوختگی، به عنوان پاتوژن عمده‌ی انسانی شناخته شد. از آن زمان، این باکتری به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت‌های باکتریایی و عفونت بیمارستانی در ریه‌ها، خون و مجاری ادراری مورد توجه واقع شده است. همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی و افزایش مقاومت چند دارویی این باکتری حائز اهمیت بوده است (۵). در سال ۱۹۹۰، میگولا^۸، نام ژنریک سودوموناس را اتخاذ و گونه آن را سودوموناس پیوسیانین نامید. ۱۹۹۸، داویس و همکارانش ارتباط بین باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا را کشف کردند و این پدیده را کوئوروم سنسینگ گزارش نمودند (۶). سودوموناس آئروژینوزا به خاطر تولید فرآورده‌های گوناگون خارج سلولی و عدم اطلاع از چگونگی دقیق بیماری‌زایی آن به تدریج اهمیت و جایگاه ویژه‌ی خود را در علوم بیولوژی و پزشکی پیدا کرده و

1-Doggett

2-Pseudomonas aeruginosa

3-Sedillot

4-Fordos

5-Luke

6-Gessard

7-Osler

8-Migula

هم‌گام با تکوین این یافته‌ها نام‌های گوناگونی را مانند: *باکتریوم آئروژینوزوم*، *باکتریوم آئروژینوم*، *میکروکوکوس پیوسیانیوس*، *باسیلوس آئروژینوزوس*، *باسیلوس پیوسیانیوس*، *پسودوموناس پیوسیانه*، *باکتریوم پیوسیانیوم*، *پسودوموناس پلی کلرو پسودوموناس وندرلی* و در نهایت *سودوموناس آئروژینوزا* را برای آن در نظر گرفتند (۴،۷،۸).

۱-۲-۴- نام‌گذاری سودوموناس آئروژینوزا

واژه‌ی یونانی سودو به معنی کاذب می‌باشد و در هنگام نام‌گذاری در ابتدای نام خانواده قرار داده شده است. واژه‌ی موناس به معنی واحد می‌باشد، ریشه‌ی کلمه *mon* در تاریخچه میکروبیولوژی برای اشاره به جرم کاربرد داشته و غالباً در عفونت‌هایی که نیاز به اکسیژن دارند به کار رفته است. اسم خاص آئروژینوزا در زبان لاتین به معنای اکسید مس (پر از لکه‌هایی به رنگ مس) می‌باشد. در واقع، علت اصلی چنین تعبیری در مورد این باکتری‌ها مربوط به رنگ پیگمان (سبز یا آبی متمایل به سبز) تولید شده در کشت حاصل از این باکتری می‌باشد (۱). هم‌چنین ممکن است پسوند یونانی *ae* به معنای پیر یا قدیمی و پسوند *ruginosa* به معنای چین‌خوردگی یا ناهمواری معنی شود (۲).

۱-۲-۵- مورفولوژی و مشخصات

۱-۲-۵-۱- ارگانسیم‌های تیپیک

سودوموناس آئروژینوزا متحرک با یک یا چند فلاژل قطبی و باسیل میله‌ای شکل با اندازه‌ی تقریبی ۰/۵ - ۰/۸ میکرومتر در ۳ - ۱/۵ میکرومتر می‌باشد. این ارگانسیم گرم منفی است، به صورت‌های منفرد، جفتی و گاهی در زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شود و فاقد اسید فاست و اسپور می‌باشد (۳،۹).

۱-۲-۵-۲- کشت

سودوموناس‌ها بر روی اکثر محیط‌های آزمایشگاهی مثل بلادآگار و محیط‌های کشت افتراقی که برای رشد انتروباکتریاسه بکار می‌رود (مانند مک‌کانکی) رشد می‌کنند. روی محیط SS در حدود ۸۸٪ موارد رشد دارند. در محیط TSI فرم قلیا/قلیا (ALK/ALK) ایجاد کرده و روی سطح شیب‌دار آن کلنی‌هایی با جلای فلزی مشاهده می‌شود. کشت، آزمایش اختصاصی برای تشخیص عفونت‌های سودوموناس/آئروژینوز/می‌باشد (۱۰، ۱۱).

۱-۲-۵-۳- خصوصیات رشد

سودوموناس/آئروژینوز/ در pH خنثی و محدوده وسیعی از دما 4°C - 42°C به خوبی رشد می‌کند، دمای بهینه رشد آن 35°C است. رشد در دمای 4°C وجه تمایز آن با گونه‌های سایکروفیل سودوموناس پوتیدا/ و سودوموناس فلورسنس، در دمای 42°C به افتراقش از سایر گونه‌های فلوئورسنت سودوموناس کمک می‌کند. این ارگانسیم اکسیداز مثبت و غیرتخمیرکننده است و کربوهیدرات‌های نسبتاً کمی مانند گلوکز، ریبوز و گلوکونات را از طریق متابولیسم اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌دهد (۳، ۱۲، ۱۳).

۱-۲-۶- ژنتیک

بیماری‌زایی متنوع سودوموناس/آئروژینوز/ نشان می‌دهد که این باکتری دارای ژنوم منحصر به فردی است. تعیین توالی ژنوم ۲۰۰۰ سودوموناس/آئروژینوز/ انجام گرفته نشان می‌دهد ژنوم آن‌ها از ۶/۳ میلیون جفت باز در ۵۵۷۰ ژن تشکیل شده است. ۸/۴٪ از این ژن‌ها، ژن‌های تنظیمی را شامل می‌شود و سودوموناس/آئروژینوز/ را با بیشترین تعداد ژن‌های اختصاصی برای تنظیم یک باکتری بیماری‌زا و سازگارپذیر، در محیط‌های نامساعد می‌سازد. کروموزوم این باکتری غنی از G+C (۷۰-۵۰ درصد) می‌باشد ۱۰٪ از ژنوم آن متغییر است که در جزایر سازمان می‌یابد. جزایر فاکتورهای بیماری‌زای شناخته شده از جمله ExoU را کد می‌کنند، بدین ترتیب این

جزایر، جزایر پاتوژنیسیته^۱ نامیده می‌شوند که بیشترین تنوع بیماری‌زایی را برای سودوموناس آئروژینوزا فراهم می‌کنند (۱۴).

۱-۲-۷- ساختمان آنتی‌ژنیک

سودوموناس آئروژینوزا از نظر آنتی‌ژنی گوناگون بوده و دارای انواع آنتی‌ژن‌های O،H و پیلی می‌باشد. تجزیه‌ی آنتی‌ژنی، بر اساس انواع لیپوپلی‌ساکارید O وجود ۱۷ سروتایپ را مشخص کرده که با واکنش آگلوتیناسیون قابل شناسایی‌اند. آنتی‌ژن پروتئینی پوشش خارجی به نام OMP در همه‌ی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد و آنتی‌ژن مشترک گونه محسوب می‌شود. فاژ تایپینگ در این باکتری از لحاظ اپیدمیولوژیک و باکتریوسین تایپینگ مانند پیوسین تایپینگ در پی‌گیری انتشار اپیدمیک عفونت‌های بیمارستانی ارزش ویژه‌ای یافته است (۱۵).

۱-۲-۸- متابولیسم

متابولیسم سودوموناس آئروژینوزا بجز مواقعی که در حضور نیتрат رشد می‌کند و آنرا به نیتريت احیا می‌نماید، در سایر موارد هوازی اجباری می‌باشد. سودوموناس قادر به تخمیر کربوهیدرات‌ها نیست، اما از لحاظ تغذیه انعطاف‌پذیر است و قادر به متابولیزه بیش از ۸۰ ماده آلی بوده و حتی بر روی ساده‌ترین محیط‌های کشت نیز قابل رشد می‌باشد. این خصوصیات متابولیکی، نقش سودوموناس را در طبیعت نمایان می‌سازد. این باکتری در آب و خاک یافت شده و در تجزیه مواد آلی نقش دارد (۱۶، ۳).

1-Island pathogenesis

۱-۲-۹- خصوصیات بیوشیمیایی

سودوموناس آئروژینوزا دارای قدرت پروتئولیتیکی قوی بوده و ژلاتین را به سرعت هیدرولیز می‌کند. اوره‌آز، اکسیداز، کاتالاز و آرژنین دهیدرولاز مثبت است. لیزین دکربوکسیلاز، لاکتوز و اورنیتین دکربوکسیلاز منفی است. IMViC=---++ و روی KIA و TSI به صورت AIK/AIK است و H₂S منفی است (۱۷، ۱۸).

۱-۲-۱۰- بیوفیلم^۱

معمولاً باکتری‌ها در طبیعت به صورت به هم چسبیده یافت می‌شوند؛ اجتماعات به هم چسبیده‌ی سلول‌ها تشکیل بیوفیلم را می‌دهد. باکتری‌های تثبیت شده روی یک سطح همگی به وسیله‌ی یک ماتریکس از مواد پلیمری آلی با منشاء میکروبی (اگزوپلیمر گسترده گلیکوکالیکس) احاطه شده‌اند. این اگزوپلی- ساکاریدها که بیش از ۹۰٪ وزن خشک بیوفیلم را تشکیل می‌دهند؛ باعث تسهیل اتصال به سطح، تشکیل میکروکلنی و مقاومت به مواد ضد میکروبی می‌شود. ساختار فیزیکی بیوفیلم‌ها از لایه‌های نازک حصیری مسطح تا ترکیبات شبه قارچی متغیر است. در برخی موارد بیوفیلم‌ها با یک گونه باکتری به وجود می‌آید که monoculture نامیده شده است، ولی بیوفیلم‌های تشکیل شده بر روی سطوح مخاطی مثل روده، ریه و غیره که بیشتر آمیزه‌ای از گونه‌های گوناگونی از باکتری‌ها می‌باشند را multiculture گویند. از ویژگی‌های قابل ملاحظه‌ی زندگی گروهی در قالب بیوفیلم می‌توان به افزایش چشم‌گیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها، حفاظت از استراتژی‌های محیطی از جمله پاسخ ایمنی میزبان، به علاوه سهولت انتقال ژن و اشتراک تولیدات متابولیک در داخل اجتماعات بیوفیلم به دلیل مجاورت نزدیک سلول‌ها اشاره کرد. آلترینات تولید شده توسط باکتری‌های گرم منفی مختلف از جمله سودوموناس آئروژینوزا عامل اصلی تولیدکننده‌ی بیوفیلم می‌باشد (۶، ۱۹، ۲۰).

۱-۲-۱۱- کوئوروم سنسینگ^۱

مکانیسم ارتباط سلول به سلول در باکتری‌ها و میان‌کنش آن‌ها از طریق تبادل اطلاعات با سایر سلول‌ها کوئوروم سنسینگ نامیده می‌شود. یکی از تفاوت‌های باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت کنترل غلظت سلولی و بیان فاکتورهای بیماری‌زا از طریق سیگنال‌های شیمیایی کوئوروم سنسینگ می‌باشد. از جمله فرایندهای فیزیولوژیکی تحت کنترل کوئوروم سنسینگ می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

بیولوژیک، تولید متابولیت‌های ثانویه، تولید آنتی‌بیوتیک، سوارمینگ، تشکیل بیوفیلم، حفاظت از مکانیسم دفاعی میزبان، اسپورولاسیون، تولید فاکتورهای ویروالانس و غیره. کوئوروم سنسینگ نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم دارد، به این دلیل کوئوروم سنسینگ و بیوفیلم مرتبط به هم هستند. سیستم کوئوروم سنسینگ *S. aureus* از نوع تیپ LuxIR است، ویروالانس *S. aureus* آئروژینوزا توسط دو سیستم تیپ *lux* مجزا از هم که *las* و *rhl* نام دارند کنترل می‌شود. نامگذاری این دو سیستم برگرفته از اثرگذاری آن‌ها بر روی تولید الاستاز (*las*) و رامنولپید (*rhl*) است. سیستم *las* و *rhl* در پردازش و تولید فاکتورهای ویروالانس متعددی نقش دارند که عبارتند از: الاستاز، آکالین پروتئاز، اگزوتوکسین A، رامنولپیدها، پیوسیانین، لکترین‌ها و سوپراکسید دیسموتاز. مولکول‌های سیگنالینگ در سه گروه عمده طبقه‌بندی می‌شوند: آسیل هموسرین لاکتون‌ها^۲ (AHLs)، الیگوپتیدها و LuxS/autoinducer 2. تیپ‌هایی که از نظر شیمیایی به هم مرتبطند با ارائه‌ی سیگنالینگ سلول به سلول یک مجموعه‌ی گسترده از مولکول‌های کاملاً متنوع از نظر ساختاری را تشکیل می‌دهد (۶، ۲۱).

1 - Quorum sensing

2- Acyl-homoserine lactones

۱-۲-۱۲- فاکتورهای باکتریایی درگیر در بیماری زایی

سودوموناس آئروژینوزا ساختارها و تولیدات سلولی متنوعی مانند ادهزین‌ها، پروتئازها و غیره را بیان می‌کند که در ارتباط با توانایی آن در ایجاد بیماری می‌باشد (۱۴).

۱-۱۲-۲-۱- فاکتورهای بیماری‌زای سطح سلولی

فاکتورهای بیماری‌زای سطح سلولی سودوموناس آئروژینوزا شامل موارد زیر می‌باشد:

۱-۱-۱۲-۲-۱- فلاژل

همه‌ی گونه‌های موجود در جنس سودوموناس به استثناء سودوموناس مالئی که فاقد فلاژل است، متحرک بوده و دارای فلاژل می‌باشند. تعداد و محل قرارگیری فلاژل‌ها در شناسایی گونه‌های مختلف سودوموناس اهمیت دارند. فقدان فلاژل در برخی سویه‌ها در مدل‌های حیوانی، سبب کاهش شدید ویرولانسی شده، فلاژل سبب کموتاکسی و حرکت باکتری در طی دوره تهاجم به بافت‌ها می‌گردد. دو نوع فلاژلین (پروتئین سازنده فلاژل) در ساختمان فلاژل این باکتری به کار رفته است: نوع a که هتروژنوس بوده و دارای وزن مولکولی ۴۶-۵۲ kDa بوده و نوع b که هموژنوس می‌باشد و وزن مولکولی آن ۵۳ kDa ذکر شده است. فلاژلین‌ها اغلب می‌توانند به عنوان لیگاندهایی برای ماکروفاژها و سایر سلول‌های فاگوسیت عمل کنند. فلاژل در بیماری‌زایی نقش مهمی را از طریق اتصال به اجزا غشاء ایفا می‌کند. فلاژل ایمونوژنیک قوی محسوب می‌شود و ایمونیزاسیون غیرفعال با آنتی‌بادی ضد فلاژلی موجب کاهش تهاجم سیستمیک و سپتی‌سمی می‌شود. فلاژل بعنوان یک کاندید مهم برای طراحی واکسن محسوب می‌شود (۱۴).

۱-۲-۱۲-۲-۱- پیلی

پیلی یا فمبریه رشته‌های نازک در سطح سودوموناس *آئروژینوزا* می‌باشند. بسیاری از سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* دارای تعداد زیادی از پیلی نوع IV هستند که در سطح باکتری توزیع شده‌اند که اغلب قطبی و گاهی پیرامونی می‌باشند. پیلی این باکتری به دلیل عدم انجام آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز از سایر باکتری‌های روده‌ای متمایز می‌شود. هم چنین پیلی این باکتری به دلیل حرکات انقباض ناگهانی که ناشی از توانایی جمع شدن پیلی است، نسبت به پیلی سایر پروکاریوت‌ها پیچیده می‌باشد که امکان انتشار در سطوح آبی و کلونیزاسیون سریع در مسیر جریان هوا را تسهیل می‌کند. پیلی مسئول حرکت باکتری‌ها در سطوح جامد (حرکت twitching) و نیز اتصال و ورود برخی باکتریوفازها می‌باشد. این نوع پیلی، از پلیمرهای پروتئینی (از زیر واحدهای پیلین) تولید شده از یک تک ژن تحت عنوان *PilA*، ایجاد می‌شود. ولی اسمبلی و عملکرد آنها شامل تعداد زیادی ژن مانند *pilc, e, d, b* می‌باشد. پیلی اتصال به موسین و سلول‌های اپی‌تلیال را واسطه‌گری می‌کند اما وجود آن برای بیماری‌زایی ضروری نیست زیرا سویه‌های فاقد فمبریه نیز قدرت بیماری‌زایی را دارند. حضور پیلی در تشکیل بیوفیلم، اتصال به فاز، ترانسفورماسیون، تغییر جهت و نحوه‌ی حرکت و کلونیزاسیون و اتصال به DNA نقش دارد (۱۴).

۱-۲-۱۲-۳-۱- لیپوپلی ساکارید^۱

LPS ساختار اختصاصی دیواره‌ی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که از یک لیپید پیچیده به نام لیپید A و یک قسمت پلی ساکاریدی متصل به آن تشکیل شده است. از عملکردهای LPS می‌توان به حفاظت سلول‌های باکتریایی در مقابل اپسونیزاسیون، ایجاد تأثیر متوسط بر مقاومت باکتری در برابر فاگوسیته شدن به وسیله سلول‌های پلی‌مورفونوکلتر، مقاومت نسبت به عمل باکتریوسیدی کمپلمان در سرم، گیرنده باکتریوفازی، ممانعت

1- Lipopoly saccharid

از نفوذپذیری غشاء خارجی و نقش در پدیده‌ی شناسایی باکتری‌ها اشاره کرد. قسمت لیپید A لیپوپلی‌ساکارید از نظر ساختاری به دلیل داشتن گروه‌های فسفات‌ها بیشتر و فقدان بتا‌هیدروکسی مریستیک اسید از دیگر باکتری‌های گرم منفی، متفاوت است. زنجیره جانبی O خاصیت ویروالانس داشته چرا که سویه‌های واجد موتانت در این زنجیره، در مقایسه با سویه وحشی خود غیرویرولان می‌باشند (۱۶،۲۲).

۱-۲-۱۲-۴- آلژینات

آلژینات کپسول پلی‌ساکاریدی این باکتری می‌باشد. این اگزوپلی‌ساکارید موکوئیدی از پلیمرهای تکراری D-مانورونیک اسید و L-گلوکورونیک اسید ساخته می‌شود. آلژینات همانند LPS سبب اتصال سودوموناس *آئروژینوزا* به اپی‌تلیال تنفسی می‌شود. رونویسی ژن‌های بیوسنتز آلژینات زمانی که سودوموناس‌ها به سطوح سلولی متصل می‌شوند، القاء می‌شود، در نتیجه تولید آلژینات افزایش می‌یابد. بیان آلژینات در غلظت پائین نیتروژن و اسمولاریته بالا بهتر صورت می‌گیرد، ژن‌های کدکننده آلژینات روی کروموزوم قرار گرفته و باعث سنتز آنزیم‌های مختلفی می‌شود مثلاً ژن *AlgC* کدکننده آنزیم فسفومانو موتاز و ژن *AlgD* کدکننده آنزیم GDP-مانوز دهیدروژناز می‌باشد که آنزیم کلیدی در سنتز آلژینات است. از دسته ژن‌های تنظیمی آلژینات می‌توان به AlgP, Q, S, T, R اشاره کرد. AlgS, T باعث مهار ژن‌های سنتزکننده آلژینات می‌شوند، AlgQ, R ژن‌های فعال‌کننده نسخه برداری (R) می‌باشند.

عملکردهای بیماری‌زای مرتبط با آلژینات در سویه‌های موکوئیدی این باکتری شامل: مهار و تداخل مستقیم فاگوسیتوز، حفاظت باکتری از آنتی‌بیوتیک‌ها و هر نوع پاسخ حفاظتی میزبان، تشکیل بیوفیلم، جلوگیری از کموتاکسی لکوسیت‌ها، کسب رادیکال‌های آزاد سمی، توانایی تولید آنتی‌بادی از طریق عملکرد ادجوانتی، تحریک پاسخ لکوسیت‌های پلی‌مورفونکلئر، اتصال به موسین‌ها، تسهیل

فعالیت کمپلمان، افزایش رادیکال‌های اکسیژن سمی و شکل‌گیری میکروکلنی باکتریایی در شرایط زنده می‌باشد (۲۳، ۲۰، ۱۹، ۱۵، ۱۴).

۱-۲-۱۲-۲- فاکتورهای بیماری‌زای ترش‌حی

فاکتورهای بیماری‌زای ترش‌حی سودوموناس آئروژینوزا شامل موارد زیر می‌باشد:

۱-۲-۱۲-۲-۱- پیوسیانی

پیوسیانی رنگ‌دانه‌ی آبی تولید شده توسط سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. این پیگمان منحصر به این ارگانیسم بوده به همین علت نام دیگر این باکتری باسیل پیوسیانیک است که در ۵۰ درصد سویه‌ها تولید می‌شود و در کسب فسفر نقش دارد. پیوسیانی اثرات بیماری‌زای متعددی هم چون افزایش IL-8، تضعیف پاسخ ایمنی میزبان و القاء آپوپتوزیس در نوتروفیل‌ها را نشان می‌دهد. این رنگ‌دانه تولید سوپراکسید و پراکسید هیدروژن که اشکال سمی اکسیژن هستند را کاتالیز می‌کند. فعالیت‌های پیوسیانی عبارتند از: تولید واسطه‌های نیتروژنی فعال، کنترل سیستم عدم تعادل الاستاز- آنتی‌الاستاز به وسیله‌ی افزایش رهاسازی الاستاز نوتروفیلی و افزایش غیرفعال شدن اکسیداتیو مهارکننده α -۱- پروتئاز می‌باشد. استراتژی‌های ایمونوتراپی مستقیماً پیوسیانی را هدف قرار می‌دهد (۲۵، ۲۴، ۱۴، ۱۱).

۱-۲-۱۲-۲-۱- پیووردین

این پیگمان با وزن مولکولی ۱۵۰۰ دالتون، محلول در آب و غیر محلول در کلروفرم می‌باشد. پیووردین یک سیدروفور می‌باشد، مولکول کوچکی که آهن را از محیط برای استفاده در متابولیسم سودوموناس آئروژینوزا کسب می‌کند. علاوه بر پیووردین این باکتری نیاز به سیدروفور دیگر پیوچیلین برای دسترسی به آهن و کسب قدرت تهاجمی بیشتر دارد. نقش پیووردین در بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا به اثبات رسیده است؛ به

طوری که اخیراً معلوم شده است ترشح پیووردین توسط دیگر فاکتورهای بیماری‌زای سودوموناس آئروژینوزا از جمله اگزوتوکسین A و اندوپروتئاز و دیگر ترشحات کنترل می‌شود (۱۴،۲۶).

۱-۲-۱۲-۳-آلکالین پروتئاز

آلکالین پروتئاز (پروتئاز قلیایی) یک پروتئاز لیزکننده‌ی فیبرین می‌باشد که توسط سودوموناس آئروژینوزا از طریق سیستم ترشحاتی تیپ I ترشح می‌شود. اگرچه نقش بیماری‌زایی آن فقط در عفونت‌های قریه‌ای مشهود است، اما احتمال می‌رود در بیماری‌زایی عفونت ریوی حاد از طریق ممانعت از شکل‌گیری فیبرین اولیه شرکت کند. این پروتئاز باعث شکستن IL-2 می‌شود و در سرکوب ایمنی نقش دارد (۱۴).

۱-۲-۱۲-۴-پروتئاز IV

پروتئاز IV در بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا نقش دارد. این آنزیم در تخریب قریه و ایجاد کراتیت نقش دارد. اخیراً نقش آن در بیماری‌زایی عفونت ریوی از طریق تخریب پروتئین‌های سورفاکتانت A، B و D نیز ثابت شده است (۱۴).

۱-۲-۱۲-۵-الاستاز

الاستاز توسط سیستم ترشحاتی تیپ III سودوموناس آئروژینوزا به فضای خارج سلولی ترشح می‌شود. این آنزیم بسیاری از پروتئین‌ها نظیر: الاستین ریه انسان، ایمونوگلوبولین‌ها، فاکتورهای کمپلمان، اجزاء غشاهای پایه و موسین‌ها را تجزیه می‌کند. فعالیت الاستولایپتیک آن نتیجه فعالیت حداقل دو پروتئین LasA (سرین پروتئاز) و LasB (متالوپروتئاز حاوی روی) است، که تحت کنترل ژن lasR می‌باشند. این آنزیم با تجزیه ترانسفرین میزبانی در اکتساب آهن نقش دارد. همچنین با فعال کردن آنزیمی تحت عنوان MMP2 (Matrix metalloproteinase-2) که به وسیله سلول‌های قریه تولید می‌شود به چشم‌ها آسیب رسانده و با تجزیه

کلاژن‌های تیپ IV, V, VI باعث ایجاد کراتیت می‌شود. الاستاز با تخریب IL-2، CD16 و اجزا کمپلمان به عنوان ایمونوساپرسور مطرح است (۱۴).

۱-۲-۱۲-۲-۶- فسفولیپاز C

سودوموناس آئروژینوزا دو نوع فسفولیپاز تولید می‌کند یکی با وزن مولکولی بالا که همولیتیک بوده و دیگری فسفولیپاز با وزن مولکولی پایین که غیرهمولیتیک می‌باشد. فسفولیپاز C حساس به حرارت بوده، این آنزیم خصوصاً نوع همولیتیک آن از سیستم ترشحی تیپ III سودوموناس آئروژینوزا به فضای خارج سلولی ترشح می‌شود. این دو می‌توانند فسفوریل کولین را که ماده‌ی اصلی سورفاکتانت ریه است را تجزیه نموده و موجب آزاد شدن دی‌آسیل گلیسرول و کولین شده که منجر به تشکیل پروستاگلاندین‌ها، ترومبوکسان‌ها و لکوترین‌ها می‌گردد. فسفولیپاز C همولیتیک فسفولیپیدهای غشاء یوکاریوت‌ها را هدف قرار می‌دهد و در بیماری‌زایی آسیب‌های ریوی شدید سودوموناس آئروژینوزا شرکت می‌کند، به علاوه منجر به سرکوب نوتروفیل میزبان می‌شود. این آنزیم هنگامی که میزان قند محیط بالا بوده و میزان فسفر آن پائین باشد تولید می‌شود (۱۴، ۱۷، ۲۷).

۱-۲-۱۲-۲-۷- رامنولیپیدها

گلیکولیپیدی است که فعالیت شبه دترجنتی داشته و فسفولیپیدهای غشایی را تجزیه می‌کند. دو نوع رامنولیپید توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید می‌شود: ۱- مونو رامنولیپید ۲- دی رامنولیپید. از جمله عملکردهای رامنولیپید می‌توان به توقف زنش مژک‌ها، تحریک ترشح موسین، تخریب ماکروفاژهای مشتق شده از منوسیت‌ها، ممانعت از فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها، اختلال انتقال یون در سلول‌های اپی‌تلیال، توسعه‌ی بیوفیلم، تنظیم پاسخ کوئوروم سنسینگ و حرکت شناور باکتری اشاره کرد (۱۷، ۲۷، ۲۸).

۱-۲-۱۲-۸-اگزوتوکسین A

اگزوتوکسین A سم اصلی تولید شده توسط *سودوموناس آئروژینوزا* و یکی از عوامل مهم مرگ و میر می باشد. این توکسین در تمامی سویه ها تولید نمی شود و در سویه های مولد توکسین شدت بیماری زایی بیشتر است. این آنزیم از ۶۱۳ اسید آمینه با وزن مولکولی ۶۶KD تشکیل شده است و توسط سیستم ترشحی تیپ II به فضای خارج سلولی ترشح می شود. این آنزیم باعث غیر فعال شدن EF_2 ، توقف سنتز پروتئین و تخریب سلول های یوکاریوتی می گردد. اگزوتوکسین A، با تاثیر بر روی گلبول های سفید و تغییر در عملکرد و تعداد آنها در نهایت موجب نقص در سیستم ایمنی بیماران بخصوص بیماران سوختگی عفونی شده می شود.^۱ ETA دارای دو جزء است: قسمت A با وزن مولکولی ۲۱۰۰۰Da که خاصیت آنزیماتیک دارد. قسمت B با وزن مولکولی ۳۷۰۰۰Da که به عنوان قسمت متصل شونده عمل می کند. ETA توسط یک ژن ساختاری تحت عنوان *tox A* کد شده و به وسیله دو ژن *regA* و *regB* که روی یک اپران قرار دارند، تنظیم می شود (۱۴،۲۹).

۱-۲-۱۲-۳-سیستم ترشحی تیپ III

سیستم ترشحی تیپ III (TTSS) در میان یرسینیا، سالمونلا، شیگلا و گونه های *سودوموناس* به عنوان یک مکانیسم در تزریق مستقیم سموم به سلول های میزبان عمل می کند. سیستم ترشحی تیپ III *سودوموناس آئروژینوزا* متشکل از ۲۰-۳۰ پروتئین بوده و ساختار شبه پیلوسی داشته که امکان انتقال مستقیم سایتوتوکسین ها را از غشاء باکتریایی به سیتوپلاسم یوکاریوت ها از طریق ساختار سوزن مانند با تشکیل سوراخ در غشاء یوکاریوت ها را می دهد. سه سایتوتوکسین ExoS، ExoT و ExoU به طور متغیر در استرین های مختلف بیان می شود و توسط سیستم ترشحی تیپ III *سودوموناس آئروژینوزا* به سلول های میزبان تزریق می شود. این سایتوتوکسین ها از ایمنی طبیعی میزبان جلوگیری می کنند (۱۴،۳۰).

1-Exo toxin A

- **ExoS (اگزوآنزیم S):** یک پروتئین دو عملکردی است که مانع از فاگوسیتوز باکتری توسط فاگوسیت‌ها می‌شود، همچنین در تهاجم باکتری به درون سلول‌های غیرفاگوسیتی نقش داشته و موجب القای آپوپتوزیس سریع در سلول‌های میزبان می‌شود. این آنزیم انتقال ADP-ریبوز را از NAD^+ به سایر پروتئین‌های یوکاریوتی (غیر از EF2) کاتالیز می‌کند. از پروتئین‌های هدف آن Vimentin، Ras و چندین پروتئین که به GTP متصل می‌شوند را می‌توان نام برد. به دلیل اینکه پروتئین‌های اتصال به GTP در حرکت لیزوزوم‌ها دخالت دارند، ETS ممکن است موجب محافظت سودوموناس *آئروژینوزا* در مقابل کشته شدن توسط ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها شود (۳۱).

- **ExoT:** سایتوتوکسین کوچکی است که مشابه ExoS فعالیت‌های GAP و ADP-ریبوزیل ترانسفرازی دارد. ExoT اثرات مشابهی روی اسکلت سلولی یوکاریوتی دارد (۱۴،۳۰).

- **ExoU:** فعالیت فسفولیپاز / لیزوفسفولیپازی دارد. غشاهای سلول یوکاریوتی را تخریب می‌کند. ExoU به عنوان سایتوتوکسین قوی ترشح شده از طریق TTSS شناخته شده است. فعالیت سایتوتوکسیسیته‌ی شدیدی در سلول‌های اپی‌تلیال و ماکروفاژها دارد (۱۴،۳۰).

۱-۲-۱۳- بیماری‌زایی سودوموناس *آئروژینوزا*

سودوموناس *آئروژینوزا* یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی بخصوص در بیماران سیستمیک فیبروزیس، سوختگی‌ها و افراد دچار نقص سیستم ایمنی می‌باشد. سپسیس ناشی از این باکتری یک عارضه جدی متعاقب عفونت سوختگی است (۳۲). بیماری‌زایی سودوموناس *آئروژینوزا* به فاکتورهای بیماری‌زای ترشحی و سطح سلولی وابسته است. بیماری‌های ناشی از سودوموناس *آئروژینوزا* نشان‌دهنده‌ی فراوانی فاکتورهای بیماری‌زایی این پاتوژن می‌باشد که امکان کلونیزاسیون و عفونت در همه‌ی بافت‌های پستانداران را فراهم می‌کند. سودوموناس *آئروژینوزا* دارای فاکتورهای بی‌شماری است که منجر به

افزایش چسبندگی به سلول‌های میزبان، آسیب به بافت میزبان، فراخوانی التهاب و اختلال مکانیسم‌های دفاعی می‌شود. سودوموناس آئروژینوزا گروه متنوعی از عفونت‌ها شامل: عفونت جراحات سوختگی، سیستمیک فیبروزیس، عفونت مجاری ادراری، عفونت سیستم تنفسی، عفونت جراحی، آماس پوست، عفونت‌های بافت نرم، عفونت استخوان و مفصل، عفونت‌های گوارشی، عفونت قرنیه، عفونت‌های خونی، باکتری‌می، انواع عفونت‌های سیستمیک، پنومونی و سپتی‌سمی خصوصاً در بیماران نوتروپنی و پیوندی را ایجاد می‌کند (۳۳-۳۵، ۱۳). عفونت سودوموناس آئروژینوزا مشکل جدی در بیماران بستری مبتلا به سرطان، سیستمیک فیبروزیس و سوختگی محسوب می‌شود؛ به طوری که میزان مرگ‌ومیر در این بیماران نزدیک به ۵۰٪ است. سودوموناس آئروژینوزا در درجه اول یک پاتوژن بیمارستانی است و مهم‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد که منجر به سپتی‌سمی و مرگ می‌شود (۳۴، ۳۵).

۱-۲-۱۴- بیماری‌های سودوموناس آئروژینوزا

۱-۲-۱۴-۱- باکتری‌می

سودوموناس آئروژینوزا یکی از خطرناک‌ترین میکروارگانیسم‌هایی است که می‌تواند منجر به باکتری‌می شود. باکتری‌می سندرم خطرناکی است که نیازمند درمان‌های چند آنتی‌بیوتیکی است. فراوانی باکتری‌می با سودوموناس آئروژینوزا امروزه در مطالعات مختلف ۲۰-۵٪ گزارش شده است و سپتی‌سمی آن اغلب در افراد مسن و دارای ضعف سیستم ایمنی به خصوص دارای گرانولوسیتوپنی شایع است. سودوموناس آئروژینوزا چهارمین عامل ایجاد کننده باکتری‌می اولیه اکتسابی از بیمارستان می‌باشد. باکتری‌می ممکن است با ضایعات اریتماتوز پوستی همراه باشد که به آن اکتیما گانگرونوزوم^۱

1- Ecthyuma gangrenosum

می‌گویند. اکتیما گانگرونوزوم اغلب به صورت ضایعات پتشی در ناحیه پرینه، زیر بغل یا روی اندام‌ها دیده می‌شود که ضایعات، زخمی شونده و حاوی سودوموناس *آئروژینوزا* می‌باشند. بین سال‌های ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹، ۴۰٪ باکتری می سودوموناسی در اروپا و آمریکای لاتین اتفاق افتاده است. بنابراین ممکن است که فاکتورهای طبیعی و شرایط اقلیمی در بروز این بیماری موثر باشند (۱۵،۳۶،۳۷).

۱-۲-۱۴-۲- عفونت‌های دستگاه تنفسی

دستگاه تنفسی شایع‌ترین محل برای لانه‌گزینی سودوموناس *آئروژینوزا* می‌باشد. این ارگانیزم رتبه‌ی اول را به عنوان پاتوژن مسبب پنومونی مربوط به دستگاه تنفس مصنوعی دارد که در عرض ۲۴-۴۸ ساعت بر روی دستگاه کلونیزه می‌شود. این ارگانیزم با تشکیل بیوفیلم درون تراشه‌های نای عفونت پنومونی ایجاد می‌نماید. پنومونی اکتسابی از جامعه توسط سودوموناس *آئروژینوزا* نادر است و معمولاً در افراد دارای بیماری‌های زمینه‌ای نظیر: بدخیمی‌ها، بیماری‌های ریوی مزمن یا سابقه مصرف مخدرهای داخل رگی، رخ می‌دهد. در بیماران بستری شده در بخش ICU بیمارستان به خصوص آنهایی که تراکئومی شده‌اند این ارگانیزم به دفعات در سیستم تنفس فوقانی کلونیزه می‌شود که تعداد کمی از این بیماران (۷٪)، مبتلا به پنومونی می‌شوند. گزارشات آمار مرگ‌ومیر ۷۰-۸۰٪ را با توجه به سختی تشخیص و درمان نشان می‌دهد. استنشاق روزانه ۳۰۰ میلی‌گرم توبرامایسین (در صورت عدم بروز مقاومت دارویی) برای درمان بیشتر توصیه می‌شود (۱۵،۳۶).

۱-۲-۱۴-۳- عفونت مزمن دستگاه تنفس

این باکتری دلیل اصلی عفونت مزمن راه‌های هوایی در افراد مستعد به عفونت مانند سیستیک فیبروزیس و بیماری پان‌برونشیت مزمن می‌باشد. بیماری با عفونت مزمن عودکننده، خلط، تب و ترشحات ریوی همراه است. درمان توسط ماکرولیدها صورت می‌گیرد، دارویی که به نظر می‌رسد اثرات

ضد سودوموناسی ندارد اما فعالیت ضد التهابی داشته و باعث توقف تولید فاکتورهای ویروالانس باکتری می شود. بیشترین داروی مصرفی کلاریترومایسین و آزیترومایسین می باشد (۱۵،۳۶).

۱-۲-۱۴-۴- عفونت استخوان و مفاصل

این عفونت حداقل از سه مکانیسم مختلف حاصل می شود: باکتری، ورود مستقیم به استخوان و عفونت هم جوار گسترش یافته. باکتری معمولاً با تزریق مستقیم داروهای آلوده ایجاد می شود که عامل اصلی استئومیلیت می باشد. تب در این بیماری وجود ندارد و در صورت وجود خود به خود فروکش می کند. کشت خون معمولاً منفی است مگر این که با اندوکاردیت همراه باشد. آرتريت سپتیک سودوموناسی با تزریق دارویی آلوده ایجاد می گردد. استئومیلیت سودوموناسی معمولاً در افرادی که دچار شکستگی یا جراحی باز شده اند دیده می شود. معمولاً آنتی بیوتیک درمانی در استئومیلیت بسیار دشوار است. درمان تک دارویی با آنتی بیوتیک های بتالاکتامی ضد سودوموناسی درمان انتخابی می باشد. سیپروفلوکساسین به دلیل نفوذ خوب در بافت های آسیب دیده استئومیلیت داروی انتخابی است. اما با توجه به مقاومت بالا به سیپروفلوکساسین درمان با مشکل مواجه شده است (۱۵،۳۸،۳۹).

۱-۲-۱۴-۵- عفونت دستگاه ادراری

عفونت اولیه دستگاه ادراری اکتسابی از جامعه به علت سودوموناس آئروژینوزا نادر است، به استثناء: افرادی که دارای اختلالات آناتومیک و جراحات طناب نخاعی هستند. اغلب عفونت های دستگاه ادراری منشاء بیمارستانی دارند که اغلب در نتیجه کاتتریزاسیون بلند مدت می باشد (تقریباً ۵٪). بعد از /شریشیا کلی و گونه های /نتروکوک، سودوموناس آئروژینوزا سومین عامل عفونت های دستگاه ادراری اکتسابی از بیمارستان می باشد. عفونت معمولاً با برداشت کاتتر یا دیگر فاکتورهای مستعد

کننده برطرف می‌شود، اما درمان عفونت های پروستاتیک در حضور سنگ‌های ادراری بسیار مشکل است (۱۵،۳۷).

۱-۲-۱۴-۶- سوختگی‌ها

سودوموناس آئروژینوز/ یکی از علل شایع عفونت در سوختگی‌هاست که از طریق فلور خود بیماران یا از محیط در زخم های سوختگی کلونیزه می‌شود. مرگ و میر ناشی از آن (معمولا ناشی از سپتی سمی)، ارتباط مستقیمی با درصد سوختگی دارد. شایع‌ترین پماد ضد سودوموناس، سولفادیازین نقره است که به صورت پروفیلاکسی اثر بیشتری دارد. افزودن cerium، خواص آنتی باکتریال و نیز تداوم آن را در اسکار زخم افزایش می‌دهد. نیترات نقره موضعی اغلب مرگ و میر بیماران با سوختگی شدید را کاهش می‌دهد. کرم سولفونامید متیله شده (mafenide)، نفوذ خوبی در اسکار زخم دارد (۱۵،۳۷).

۱-۲-۱۴-۷- زخم‌ها

سودوموناس آئروژینوز/ یکی از علل شایع جدا شده از زخم‌های جراحی است و فراوانی آن وابسته به محل، وسعت و همچنین وضعیت بالینی زمینه‌ای بیمار می‌باشد. در مطالعات انجام شده در ایالات متحده، بروز آن در زخم‌های جراحی تقریبا ۷٪ در بخش‌ها و ۱۰٪ در بیماران ICU گزارش شده است (۳۷).

۱-۲-۱۴-۸- پوست و چشم

تماس طولانی مدت با آب آلوده ($>10^6$ colony-forming units (CFU)/mL) ممکن است منجر به عفونت‌های پوستی نظیر: فولیکولیت، درماتیت مرطوب فضاها یا بین انگشتی یا التهاب گوش خارجی شود. فولیکولیت به علت سودوموناس آئروژینوز/ دارای خصوصیات: راش ماکولوپاپولار یا وزیکولوپوستولار منتشر، معمولا به دنبال شنا کردن در استخرهای شنا آلوده، چشمه‌های معدنی و

وان آب گرم ایجاد می‌شود (بیماری گوش شناگران). این بیماری‌ها معمولاً خود محدود شوند، اما گاهی درمان موضعی یا به ندرت آنتی‌بیوتیک تراپی ممکن است نیاز باشد. التهاب سطحی گوش خارجی در افراد دیابتیک و نوزادان ممکن است گاهی به شکل مهاجم و بدخیم (Malignant otitis externa) دیده شود که می‌تواند منجر به تخریب گوش خارجی و درگیری اعصاب جمجمه‌ای، با مرگ و میر ۲۰٪ گردد. سودوموناس آئروژینوزا در نوزادان می‌تواند عفونت گوش میانی ایجاد کرده و متداولترین عامل اوتیت چرکی مزمن^۱ در بچه‌ها و بالغین می‌باشد. سودوموناس آئروژینوزا در چشم به خصوص قرنیه می‌تواند اولسر و کراتیت ایجاد کند. نکروز قرنیه در اثر تولید ETA، ETS، پروتئاز و سایر محصولات سایتوتوکسیک روی می‌دهد. کراتیت سودومونایی یک اورژانس پزشکی محسوب می‌شود. سایر عفونت‌های چشمی شامل: کونژکتیویت، اندوفتالمیت و سلولیت اوربیتال می‌باشند. منبع شایع ارگاناسم در عفونت‌های چشمی: لنزهای تماسی، داروهای چشمی و ریمل‌های مژه و ابرو می‌باشند (۱۵،۳۷).

۱-۲-۱۴-۹- سیستمیک فیبروزیس^۲

سودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس یک پاتوژن اولیه محسوب نمی‌شود. محققین معتقدند که آسیب ریوی ایجاد شده در این بیماران به وسیله عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک اورئوس و هموفیلوس آنفلوانزا و تولید بیش از حد پروتئازها در موسین، فیبرونکتین را از سطح سلول‌های اپیتلیال کنده و باعث در معرض قرار گیری رسپتورهای گانگلیوزیدی (GM1) برای آدهزین‌های سودوموناس می‌شود. این حالت باعث اتصال سویه‌های پیلی‌دار غیر موکئید به اپیتلیوم تنفسی شده و باکتری در نهایت وارد ریه‌ها شده، تشکیل بیوفیلم داده و در شرایطی نزدیک به بی-^۱

1- Chronic suppurative otitis media

2- Cystic Fibrosis

هوای شروع به تولید آلژینات می‌کند. آلژینات موجب محافظت ارگانیزم در مقابل تخریب به وسیله فاگوسیت‌ها شده و عفونت مزمن ایجاد می‌شود. ریه‌ها نه تنها به وسیله فاکتورهای ویروالانس سودوموناس آئروژینوز/آسیب دیده، بلکه فاکتورهای سلولی میزبان (مانند ازدیاد حساسیت تیپ III، رهاسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و آنزیم‌های هیدرولایتیک مثل کاتالاز نیز کانونی برای ایجاد آسیب به ریه‌ها می‌باشند. اکثر ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوز/ بدست آمده از بیماران C.F، در پوشش خود یک LPS تغییر یافته از لحاظ ساختمانی دارند. این تغییرات شامل: از دست دادن تمام یا قسمتی از زنجیره جانبی پلی ساکارید O (AgO)، می‌باشد که منجر به فقدان وجود واکنش اختصاصی سروتایپ O در بسیاری از سویه‌ها می‌شود. سویه‌های دارای LPS ناقص، اغلب نسبت به اثر سرم حساسند، که نیازمند فعالیت هر دو مسیر کلاسیک و آلترناتیو کمپلمان می‌باشد. هر دو نوع LPS کامل و ناقص می‌توانند کمپلمان را فعال کنند، اما تنها در فرم ناقص LPS، کمپلکس MAC می‌تواند در غشای خارجی استقرار یابد. سویه‌های حساس به سرم توانایی بقاء در جریان خون را ندارند که این موضوع با میزان بسیار کم سپتی سمی در بیماران C.F سازگاری دارد (۳۷،۴۰).

۱-۲-۱۵- اپیدمیولوژی

بیش از ۸۰ گونه در جنس سودوموناس شناخته شده است و گونه‌های دیگر پیشنهاد شده ولی موقعیت تاکسونومیک آن‌ها هنوز نامشخص است. انتشار همه جایی سودوموناس آئروژینوز/ در محیط باعث توجه به این باکتری شده است. حداقل نیازهای تغذیه‌ای و مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها امکان بقاء در میزبان‌های گوناگون را به سودوموناس آئروژینوز/ می‌دهد. سودوموناس آئروژینوز/ عمدتاً در محیط‌های مرطوب، آب، خاک به علاوه روی میوه‌ها، سبزیجات و گل‌ها یافت می‌شود. دیگر محیط‌های مناسب برای کلونیزاسیون این باکتری شامل: استخرهای شنا، چشمه‌های معدنی، وان، روی دوش، محلول لنزهای تماسی، کف داخلی کفش، داروهای تزریقی

قاچاقی، محلول‌های آبی مصرفی در بیمارستان (مایعات دیالیز، قطرات چشمی و غیره)، تجهیزات درمانی تنفسی، سینک‌های سیفون و دستگاه‌های بخور می‌باشد. از بین موارد مذکور، استخرهای شنا به دلیل وجود شرایط مساعد برای رشد این باکتری از جمله: آب، حرارت، هوادهی و آلودگی انسانی مهم‌ترین منبع برای رشد *سودوموناس آئروژینوزا* محسوب می‌شود. *سودوموناس آئروژینوزا* به ندرت به عنوان بخش فلور میکروبی افراد سالم یافت می‌شود. در درجه‌ی اهمیت کم‌تر کلونیزاسیون در افراد سالم در مجرای گوارشی و نقاط مرطوب بدن از جمله گلو، موکوس بینی و زیر بغل رخ می‌دهد. افرادی که دچار سوختگی هستند با ریسک بالای عفونت به این باکتری مواجه‌اند. بیش از ۷٪ انسان‌های سالم این باکتری را در مخاط بینی، پوست یا حلق خود حمل می‌کنند و ۲۴٪ نیز در نمونه مدفوع گزارش شده است. کلونیزاسیون پوستی آن در بیماران دچار سوختگی بعد از گذشت ۹ روز از سوختگی، ممکن است به ۸۰٪ برسد. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که *سودوموناس آئروژینوزا* عامل تقریباً ۱۰٪ عفونت‌های بیمارستانی است، اما شیوع آن در قسمت‌های مختلف بدن و بخش‌های مختلف بیمارستان متفاوت است. نرخ شیوع آن در پنومونی‌های اکتسابی بیمارستانی ۱۵-۲۵٪ گزارش شده است. گونه‌های آن شایع‌ترین و خطرناک‌ترین میکروارگانیسم جدا شده از زخم‌های سوختگی در دهه‌های گذشته بوده است، ولی امروزه در کشورهای پیشرفته به طور قابل توجهی کاهش یافته است (۴۳-۴۱، ۱۵).

۱-۲-۱۶- تشخیص

جهت تشخیص *سودوموناس آئروژینوزا* از رنگ‌آمیزی گرم، محیط‌های کشت ساده مثل ستریماید، تست‌های بیوشیمیایی (شامل رشد در محیط مک‌کانکی آگار، تست‌های اکسیداز و کاتالاز، واکنش در محیط TSI، تست OF و بررسی تحرک) و همچنین توجه به ظاهر کلنی (مورفولوژی کلنی، تولیدات پیگمان (تولید پیگمان پیوسیانیین در محیط مولر هینتون آگار)) استفاده می‌شود (۲۴، ۲۳).

۱-۲-۱۷- واکسن و ایمونوتراپی

اگرچه درمان آنتی‌بیوتیکی در کنترل بیماری‌های عفونی در حد قابل ملاحظه‌ای پیشرفت کرده است اما بسیاری از بیماری‌های سودوموناسی با مصرف داروهای ضدسودوموناسی کاملاً درمان یا ریشه‌کن نشده‌اند بدین ترتیب بیماری‌ها مزمن گردیده‌اند. چندین آنتی‌ژن از سودوموناس آئروژینوزا برای توسعه ایمونوتراپی فعال و غیرفعال ارزیابی شده است که می‌توانند تا حدودی ایمنی حفاظت بخش ایجاد نمایند. بدین منظور از آن‌ها برای توسعه واکسن‌ها استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به LPS، آلژینات، پروتئین‌های خارج سلولی، اگزوتوکسین A، فلاژل و سلول کامل کشته شده اشاره کرد. هیچ یک از این واکسن‌ها از نظر بالینی برای استفاده‌ی افراد در معرض خطر به ویژه بیماران عفونی در دسترس نیست. با این حال، هم اکنون برخی از واکسن‌های کاندید در فاز اول تا سوم آزمایشات بالینی می‌باشد.

آلکالین پروتئاز، پروتئاز IV و الاستاز از دیگر فاکتورهای ویروالانس سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد که بررسی ایمونوتراپی آن‌ها در فاز مطالعاتی قرار دارد (۴۰).

۱-۲-۱۸- درمان بیماری‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا

تجویز بی‌رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به پیدایش ایزوله‌های مقاوم می‌شود. اکثر درمان‌ها به دلیل درمان آنتی‌بیوتیکی اولیه‌ی نامناسب با دفاع ناکافی در برابر پاتوژن‌های مقاوم چند دارویی با شکست مواجه می‌شوند. به این دلیل از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی استفاده می‌شود تا مقاومت چند دارویی را در گرم منفی‌ها پوشش دهد. پس از معرفی کاربنی سیلین، پیشرفت‌های متداومی در توسعه‌ی عوامل ضدسودوموناسی صورت گرفت که باعث توسعه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورین نسل چهارم، مروپنم و کارباپنم گردید. با وجود پیشرفت‌های زیادی که در تولید نسل‌های جدید آنتی‌بیوتیکی صورت

گرفته است اما به دلیل مقاومت چند آنتی‌بیوتیکی، دارو درمانی با استفاده از یک بتالاکتام همراه با فلوروکینولون و آمینوگلیکوزید صورت گرفت. در قرن ۲۱ پزشکان دوباره به داروهایی مثل کلیستین و پلی‌میکسین به عنوان گروه ضد میکروبی موثر روی آوردند. به طور کلی عفونت‌های مهم بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* را نباید به صورت تک دارویی درمان نمود. اگر از درمان تک دارویی استفاده شود، احتمال موفقیت پائین است و باکتری سریعاً مقاوم می‌شود. از یک پنی سیلین مؤثر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* (مزلوسیلین یا پپراسیلین) به همراه یک آمینوگلیکوزید که معمولاً جنتامایسین، توبرامایسین یا آمیکاسین می‌باشد، استفاده می‌گردد. سایر داروهای مؤثر علیه این باکتری عبارتند از: ای‌می‌پنم، آزترونام و کینولون‌های جدیدتر از جمله سیپروفلوکساسین. در میان سفالوسپورین‌های جدیدتر، سفتازیدیم و سفوپرازون مؤثر می‌باشند. سفتازیدیم در درمان اولیه‌ی عفونت‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به کار می‌رود. پلی‌میکسین E و کارباپنم‌ها موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها علیه ایزوله‌های مقاوم چند دارویی می‌باشند (۳،۹،۱۳،۱۵).

۱-۲-۱۹-آنتی‌بیوتیک‌ها

از زمان شناخته شدن موجوداتی تحت عنوان باکتری‌ها بشر همواره در چالش برای یافتن دارویی موثر بر عفونت‌های ناشی از آن بوده است. آنتی‌بیوتیک‌ها دسته‌ای از داروها هستند که برای از بین بردن عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری‌های عفونی، به صورت گسترده در سراسر دنیا مصرف می‌شوند. آنتی‌بیوتیک باید دارای صفاتی باشد تا بتوان از آن جهت درمان بیماری‌های انسان استفاده کرد که باید شامل موارد زیر می‌باشد (۴۶).

- در بدن موجود زنده قدرت ضد میکروبی قوی داشته باشد.
- در بدن بیمار واکنش زیان بخش و نامطلوب ایجاد نکند. به عبارتی سمی یا همولیتیک و یا اثرات هیستامین مانند یا واکنش‌های آلرژیک نداشته باشد و بر پروتئین‌های بدن اثر انعقادی نداشته باشد.

- در خون، سرم فیزیولوژیک و مایعات بدن محلول باشد.

- ساختمانی نسبتاً پایدار و ثابت داشته باشد.

بسیاری از مواد دارای همه این خصوصیات نیستند و تنها چند مورد را دارند که نمی‌توان آن‌ها را به عنوان آنتی‌بیوتیک ایده‌ال در نظر گرفت.

۱-۲-۱۹-۱- آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام

۱-۲-۱۹-۱-۱- آمینو گلیکوزیدها^۱

این گروه از عوامل ضد میکروبی از نظر ساختمانی در یک خانواده قرار می‌گیرند. آمینوگلیکوزیدها از ساخت پروتئین باکتری در سطح ریبوزوم جلوگیری می‌کنند. آمینوگلیکوزیدها اصولاً برای درمان عفونت‌های ناشی از باسیل‌های گرم منفی هوازی استفاده می‌شوند. آمینوگلیکوزیدها دارای هسته آمینوسیکلیتول هستند که هسته ممکن است اینوزیتول یا سایر قندهای حلقوی باشد که آمینه هستند. این هسته در اکثر آمینوگلیکوزیدها مشتقات استرپتامین است. استرپتامین نیز یک قند حلقوی آمینه است. تاثیر باکتریوسیدال آمینوگلیکوزیدها به واسطه هسته استرپتامین آنها است که سبب غلط خوانی^۲ پیام mRNA می‌شود. استرپتومایسین در غلظت کم به پروتئین S₁₂ از زیر واحد ۳۰S ریبوزومی متصل شده و با ایجاد تغییر شکل در ساختار mRNA سبب تغییر کدهای mRNA و غلط خوانی آنها توسط tRNA می‌شود. سودوموناس با تغییر از فرم صاف (S)^۳ به فرم خشن (R)^۴ و تغییر لیپوپلی ساکارید سطحی، انتقال این داروها را به داخل سلول کاهش می‌دهند. همچنین با ایجاد موتاسیون در ژن کروموزومی کد کننده پروتئین S₁₂ در زیر واحد ۳۰S ریبوزومی، مانع از شناسایی و اتصال

1- Amino glycosides

2- Miss reading

3-Smooth

4-Rough

آمینوگلیکوزیدها به زیر واحد ۳۰s ریبوزوم می‌شوند. آمیکاسین، جنتامایسین، نتیل میسین و توبرامایسین آمینوگلیکوزیدهای ضد سودوموناس هستند که تاثیر آمیکاسین بیشتر از همه است (۴۷).

۱-۲-۱۹-۲-آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام

باکتری‌ها موجودات هوشمند زنده‌ای هستند که وقتی در مقابل ناسازگاری محیطی قرار می‌گیرند، عکس العمل نشان می‌دهند. به بیان دیگر تغییرات ژنتیکی که در باکتری‌ها رخ می‌دهد، منجر به مقاوم شدن آنها و ظهور اشکال مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها می‌شود. بیشتر باکتری‌ها به طور ذاتی حساسند وقتی باکتری در معرض آنتی-بیوتیک قرار می‌گیرد، امکان بروز جهش در آن وجود دارد یعنی تغییر در اطلاعات ژنتیکی باکتری، توانایی مقاومت به آنتی بیوتیک را به باکتری می‌دهد. بتالاکتام‌ها داروهای مناسبی جهت درمان عفونت‌های باکتریایی هستند که در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. خصوصیت مشترک تمام بتالاکتام‌ها، داشتن حلقه مرکزی چهار ضلعی بتالاکتام و جلوگیری از تشکیل دیواره سلولی، به عنوان مکانیسم اولیه عملکرد است. وجود حلقه‌های اضافی یا جایگزین که به حلقه بتالاکتام اضافه می‌شوند، شاخص قرار گرفتن داروی مربوطه در یکی از زیرگروه‌های پنی سیلین^۱، سفم^۲، کارباپنم^۳ یا منوباکتام^۴ است (۴۸).

۱-۲-۱۹-۲-۱-پنی سیلین‌ها

پنی سیلین‌ها عمدتاً علیه باکتری‌های هوازی گرم مثبت و فاقد بتالاکتاماز، بعضی باکتری‌های گرم منفی هوازی و پر نیاز^۵ و بعضی باکتری‌های بی‌هوازی فعال هستند. پنی سیلین‌ها از نظر ساختمان شیمیایی دارای یک هسته اصلی و مشترک به نام اسید ۶-آمینو پنی سیلانیک می‌باشند که از یک حلقه تiazolidine متصل به یک حلقه بتالاکتام تشکیل شده است و از طرفی یک زنجیره جانبی (R-COOH) به کربن شماره ۶ حلقه بتالاکتام متصل

1 - Penicillin

2 - Cephem

3- Carbapenem

4- Monobactam

5- Fastidious

است که در واقع پنی سیلین‌ها از لحاظ فارماکولوژی و آنتی‌باکتریالی وابسته به این زنجیره جانبی هستند. پنی سیلین‌ها مانع از فعالیت آنزیم‌های ترانس پپتیداز می‌شوند و از عمل ترانس پپتیداسیون دیواره سلولی ممانعت به عمل می‌آورند. در نتیجه دیواره سلولی ساخته نخواهد شد و یا اینکه دیواره نازکی به وجود می‌آید که در برابر فشارهای داخلی باکتری حساس می‌گردد و در نتیجه غشای سیتوپلاسمی پاره شده و باکتری از بین می‌رود (۴۹).

۱-۲-۱۹-۲-۲-سفالوسپورین‌ها

سفالوسپورین‌ها دارای یک هسته آمینوسفالوسپورانیک اسید هستند که از یک حلقه بتالاکتام متصل به یک حلقه شش ضلعی دی‌هیدروتیازین تشکیل شده است. هسته آن که در هیدرولیز اسیدی ایجاد می‌شود تحت تاثیر تغییراتی قرار می‌گیرد که از آن جمله جانشینی در ریشه ۳ و ۷ است که فعالیت ضد میکروبی و خصوصیات آنرا تغییر می‌دهد. همچنین جانشینی یک گروه متوکسی در موقعیت ۷-حلقه بتالاکتام به تولید گروه جدید سفامايسين‌ها منجر می‌شود که این داروها دارای مقاومت بسیار بالایی به انواع بتالاکتام‌ها هستند. سفالوسپورین‌ها در برابر اغلب ارگانيسم‌های حساس به پنی سیلین موثر بوده و جانشین مفیدی در این موارد است. سفالوسپورین‌ها فعالیت ضد میکروبی خود را همانند پنی سیلین‌ها از طریق اختلال در عملکرد آنزیم‌های ترانس پپتیداز انجام داده و مانع سنتز دیواره سلولی در باکتری‌ها می‌شوند (۵۰، ۵۱).

۱-۲-۱۹-۲-۳-کارباپنم‌ها

کارباپنم‌ها را از طریق صناعی از تینامایسین بدست می‌آورند. تیناماسین از باکتری استرپتومایسس کالیته حاصل می‌شود. کارباپنم‌ها از یک حلقه بتالاکتام و یک حلقه غیر اشباع ۵ کربنی تشکیل شده است. دو آنتی‌بیوتیک مهم در این گروه ایم‌پنم و مروپنم می‌باشد. ایم‌پنم یکی از وسیع‌الطیف‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام است این دارو به دی‌هیدرو پپتیداز ۱ در توپول‌های کلیوی حساس است، همواره همراه با سیلاستاتین تجویز می‌شود.

طیف اثر مروپنم مشابه ایمی پنم می باشد اما به دی هیدرو پپتیداز کلیوی مقاوم بوده و عوارض جانبی کمتری دارد. گونه های مختلف سودوموناس به سرعت به ایمی پنم مقاوم می شوند، بنابراین در این موارد باید به همراه یک آمینوگلیکوزید تجویز شود (۵۲، ۵۳).

۱-۲-۱۹-۴- منوباکتام ها

منوباکتام ها خانواده منحصر به فردی از بتالاکتام ها می باشند که دارای یک هسته منوسیکلیک (اسید ۳-آمینوباکتامیک) هستند. منوباکتام های طبیعی که توسط تعدادی از باکتری های خاک تولید می شوند فعالیت ضعیف ضد میکروبی دارند اما مطالعه بر روی فعالیت و ساختمان شان به توسعه منوباکتام های سنتتیک انجامیده که فعالیت ضد میکروبی بسیار بالا و پایداری را در برابر بتالاکتامها نشان می دهند. با اصلاح ساختمان کلی این آنتی بیوتیک فعالیتش در برابر سودوموناس آئروژینوزا، هموفیلوس آنفولانزا و نیسریا بیشتر شده است. اولین داروی این گروه، آزرئونام بود که طیف فعالیت آن مشابه آمینوگلیکوزیدها می باشد. آزرئونام با اتصال به PBP_3 مانع از تقسیم سلولی باکتری می شود (۵۴).

۱-۲-۲۰- مقاومت آنتی بیوتیکی

مقاومت آنتی بیوتیکی به بروز یک ویژگی خاص در یک میکروارگانیسم گفته می شود که باعث می شود تحت تاثیر داروهای آنتی میکروبی قرار نگیرد. آن هم در حالی که قبلا نسبت به داروی مذکور حساس بوده است و به این ترتیب آن دارو دیگر موجب مرگ یا توقف رشد آن میکروارگانیسم نخواهد شد. مصرف بی رویه یا نداشتن الگوی مصرف درست آنتی بیوتیک یکی از چالش های اساسی در بروز مقاومت های باکتریایی تلقی می شود (۵۵). در بروز مقاومت دارویی فاکتورهای متنوعی دخیل است که شامل نوع باکتری عفونتزا، محل عفونت در داخل بدن، توزیع آنتی بیوتیک در بدن، غلظت دارو و وضعیت ایمنی بیمار می باشد. در تلاش انسان برای کاهش

1-Penicillin binding protein

مقاومت آنتی‌بیوتیکی بایستی به دو فاکتور مهم استفاده بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و سهولت در گسترش ژن‌های مقاومت دارویی توجه نمود. به طوری که روز به روز بر تعداد باکتری‌های مقاوم افزوده می‌شود و این امر موجب نگرانی میکروبیولوژیست‌ها، پزشکان و متخصصان صنایع دارویی شده است (۵۶).

۱-۲۰-۲-۱- چگونگی ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی

به طور کلی چهار مکانیسم عمده برای ایجاد مقاومت وجود دارد که عبارتند از (۵۷):

۱- نفوذپذیری پایین سل وال (مقاومت ذاتی)

۲- تولید بتالاکتامازها، آمینوگلیکوزیدازها و سفالوسپورینازهای خارج سلولی کروموزومی یا پلاسمیدی

۳- تغییر در جایگاه‌های پروتئینی اتصال به آنتی‌بیوتیک

۴- مکانیسم افلاکس فعال که آنتی‌بیوتیک را به خارج پمپ می‌کند.

اصلی‌ترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا کاهش تراکم درون سلولی از طریق افلاکس پمپ^۱ها، تولید بتالاکتامازهای خارج سلولی با منشاء پلاسمیدی و کروموزومی، آنزیم‌های تغییردهنده ساختمان شیمیایی آمینوگلیکوزیدها و کاهش نفوذپذیری غشاء باکتری در کانال‌های پورین‌ریز می‌باشد. دو مسیر عمده‌ی عبور آنتی‌بیوتیک‌ها از میان غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا، انتقال یون‌های منیزیم موجود در پل‌های عرضی لیپوپلی‌ساکارید باکتری و تخریب آن و مسیر دوم عبور از میان پورین‌های غیراختصاصی می‌باشد به گونه‌ای که تشکیل کانال‌های پر از آبی را در غشاء می‌دهد و به صورت یک غربال مولکولی از عبور مولکول‌های بزرگ‌تر از ۹ کیلودالتون جلوگیری می‌کند (۵۸، ۳۶، ۳۳).

1-Efflux pump

۱-۲-۲۰-۲- منشاء مقاومت دارویی

۱-۲-۲۰-۳- منشاء ژنتیکی

۱-۲-۲۰-۱- مقاومت کروموزومی

این مقاومت در نتیجه‌ی جهش خود به خودی در ژن‌های کنترل کننده‌ی باکتری به داروهای ضد میکروبی رخ می‌دهد. جهش‌های کروموزومی بیش از همه بر اثر تغییر در ساختمان گیرنده‌ی یک دارو مقاوم می‌شوند. ناحیه‌ی کوچکی از کروموزوم باکتری ژن‌های ساختمانی اغلب گیرنده‌های دارویی از جمله آمینوگلیکوزیدها را کد می‌کند. گاهی بر اثر جهش، PBPها از بین می‌رود و یا تغییر شکل می‌دهد به طوری که داروهای بتالاکتام قادر به اتصال نیستند، در نتیجه جهش‌های مقاوم نسبت به داروهای بتالاکتام به وجود می‌آید. در جهش خود به خودی، افلاکس پمپ‌ها آنتی‌بیوتیک‌ها را دفع می‌کند. کلنی باکتری‌ها با آنتی‌بیوتیک تخریب می‌شود و باکتری‌های باقی‌مانده جهش یافته و امکان مقاومت دارویی وجود دارد؛ باکتری‌های مقاوم، کلنی‌های مقاوم چندگانه ایجاد می‌کنند. جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های توپوایزومراز و جهش‌های تنظیمی که قادر به افزایش بیان ژن‌های ذاتی و اپرون‌ها هستند در برخی شرایط منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شوند (۳۳، ۵۹، ۶۰).

۱-۲-۲۰-۳- مقاومت خارج کروموزومی

مقاومت کسب شده با مبادله‌ی ژن‌ها بین سویه‌های باکتریایی از طریق جابه‌جایی قطعات DNA به عنوان پلاسمیدها حاصل می‌شود. این پلاسمیدها اطلاعات را از سلولی به سلول دیگر انتقال می‌دهند. عوامل R دسته‌ای از پلاسمیدها هستند که ژن‌های مقاومت به یک و گاهی چند داروی ضد میکروبی را حمل می‌کنند. ژن‌های پلاسمیدی مربوط به مقاومت دارو معمولاً تولید آنزیم‌هایی که سبب از بین بردن اثر داروهای ضد میکروبی می‌شوند را کنترل می‌کنند. مقاومت چند دارویی در سودوموناس

آئروژینوز/ به وسیله‌ی رخدادهای ژنتیکی متعددی از جمله کسب جهش‌های گوناگون و انتقال افقی ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی ایجاد می‌شود (۳۳, ۶۰).

۱-۲-۲۰-۴- منشاء غیر ژنتیکی

فعالیت اغلب داروهای ضد میکروبی به تکثیر فعال باکتری‌ها نیاز دارد. پس میکروارگانیسم‌هایی که به صورت متابولیک غیر فعال هستند یعنی تکثیر نمی‌یابند ممکن است به صورت فنوتیپی به داروها مقاوم گردند، با این حال نسل‌های بعدی کاملاً حساس می‌باشند. یا اینکه میکروارگانیسم ممکن است در محل‌هایی از بدن ایجاد عفونت کنند که دارو نتواند در آنجا وارد شود. اغلب مکانیسم‌هایی که قبلاً برای ایجاد مقاومت بیان شد مثل کاهش غلظت داخل سلولی دارو، کاهش جذب دارو از طریق غشا سلولی و می‌تواند از موارد غیر ژنتیکی مقاومت باشد (۶۱).

۱-۲-۲۱- بتالاکتامازها

مکانیسم اصلی مقاومت باسیل‌های گرم منفی به عوامل ضد میکروبی بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. بتالاکتامازها پروتئین‌های گلوبولاری هستند که دارای ۱۱ هلیکس آلفا و ۵ صفحه بتا می‌باشند و تاکنون ساختمان سه بعدی تعدادی از آن‌ها تعیین شده است. این آنزیم‌ها پیوند آمیدی حلقه بتالاکتام را شکسته و آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را برای باکتری بی اثر می‌کنند، در نتیجه درمان آنتی‌بیوتیکی را با شکست مواجه می‌کنند (۶۳).

۱-۲-۲۱-۱- طبقه‌بندی بتالاکتامازها

با پیدایش آنزیم‌های بتالاکتاماز در میان باکتری‌ها پدیده مقاومت در بسیاری از آنها، بخصوص باکتری‌های ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی در حال افزایش است. در نتیجه درمان عفونت‌های ناشی از آنها را با مشکلات جدی روبرو ساخته است. بتالاکتامازها به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (Bush- Jacoby- Medeiros)

طبقه‌بندی می‌شوند. طبقه‌بندی مولکولی توسط Ambler در سال ۱۹۸۰، هنگامی که فقط سکانس چهار اسید آمینه از بتالاکتامازها شناسایی شده بود، صورت گرفت. بتالاکتامازها براساس ساختار اولیه به چهار کلاس مولکولی A تا D تقسیم می‌شوند.

کلاس A: باعث هیدرولیز پنی سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌شود.

کلاس B: متالوبتالاکتامازهای وابسته به روی (zn) می‌باشد که قادر به هیدرولیز کاربام‌ها بوده و در باکتری‌هایی مانند *سریشیامارسنس* و *سودوموناس آئروژینوزا* گزارش شده‌اند. کلاس B بر اساس تفاوت آمینواسیدی که در جایگاه فعال این آنزیم‌ها وجود دارد به ۳ زیر کلاس B₁، B₂، B₃ تقسیم می‌شود

کلاس C: که از آنها می‌توان به Ampc بتالاکتامازها اشاره نمود که توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌ها و سفومايسين‌ها را دارند .

کلاس D: بتالاکتامازهایی با قدرت هیدرولیز فراوان مثل OXA¹ بر علیه کلوکسازین‌ها و اکساسیلین‌ها هستند. در طبقه‌بندی Bush، که در سال ۱۹۹۵ ارائه شد بتالاکتامازها براساس پروفایل سوبسترای و پروفایل مهارکنندگی به سه گروه و چندین زیر گروه تقسیم می‌شوند:

گروه ۱: سفالوسپورینازهایی هستند که توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مانند کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند.
گروه ۲: پنی سیلینازها یا سفالوسپورینازها یا هر دو را شامل می‌شود. توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مهار می‌شوند. بر اساس سوبسترای خود به ۸ زیر گروه 2a، 2b، 2br، 2be، 2c، 2d، 2e، 2f تقسیم می‌شوند.

گروه ۳: شامل متالوبتالاکتامازهایی هستند که در سایت فعال آنها فلز روی وجود دارد که برای تخریب حلقه بتالاکتام مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم‌ها طیف سوبسترائی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز منوباکتام (آزترئونام) هستند. این آنزیم‌ها داخل اینتگرون قرار گرفته و می‌توانند در پلاسمیدها

یا کروموزوم ادغام شوند. لذا قابلیت انتقال به سایر سویه‌های سودوموناس و باکتری‌های دیگر از جمله انتروباکتریاسه‌ها را دارند. متالوبتالاکتامازها توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مهار نمی‌شوند. بلکه توسط شلاته‌کننده‌های فلزی از قبیل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) و گروه تیول مهار می‌شوند (۶۳، ۶۴).

۱-۲-۲۱-۱- متالوبتالاکتامازها

یکی از مهمترین دستاوردهای علم پزشکی، کشف و معرفی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بود که در اواخر جنگ جهانی دوم صورت گرفت. ظهور مقاومت در میان باکتری‌ها نسبت به داروها، به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام به زمان استفاده بی‌رویه پنی‌سیلین در جنگ جهانی دوم برمی‌گردد. در آن دوران، پنی‌سیلین به عنوان داروی اعجاز قرن معرفی شد اما در اثر مصرف بیش از حد این دارو گزارشاتی مبنی بر مقاومت افراد نسبت به این دارو در نقاط مختلف جهان گزارش شده است. یکی از مهمترین مکانیسم‌هایی که، باکتری‌ها علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام به کار می‌برند تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. از آنزیم‌های بتالاکتاماز، می‌توان به متالوبتالاکتامازها اشاره کرد که توسط برخی باکتری‌های مقاوم ترشح شده و باعث مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام می‌شود. متالوبتالاکتامازها طیف سوبسترای وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز منوباکتام‌ها هستند. ژن این آنزیم‌ها داخل اینتگرون قرار گرفته و می‌توانند در پلاسمید یا کروموزوم ادغام شوند، لذا قابلیت انتقال به سایر سویه‌های سودوموناس و باکتری‌های دیگر از جمله خانواده انتروباکتریاسه‌ها را دارند. اما بطور برجسته و شاخص ژن این آنزیم در سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* به وفور مشاهده می‌شود (۶۲). آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز، اولین بار سال ۱۹۹۱ در ژاپن از باکتری سودوموناس *آئروژینوزا* گزارش شد. پس از آن از نواحی مختلف دنیا شامل آسیا، اروپا، استرالیا، امریکای شمالی و جنوبی نیز گزارش شده است. در حال حاضر سویه‌های سودوموناس *آئروژینوزا* مولد متالوبتالاکتامازها از سراسر دنیا گزارش می‌شود (۶۵).

۱-۲-۲۱-۲-۱- انواع ژن‌های قابل انتقال متالوبتالاکتامازها

متالوبتالاکتامازها بر اساس ساختار مولکولی به انواع مختلف تقسیم می‌شوند که عبارتند از: (۶۶).

AIM, GIM, IMP, SIM, SPM, VIM, DIM, NDM و KHM

۱-IMP:

آنزیم IMP از زیر کلاس B₁ می‌باشد که دارای یک فلز روی در سایت فعال آنزیم به همراه سه هیستیدین و یک سیستئین است. IMP پلاسمیدی در سال ۱۹۸۸ از سویه GN₁₇₂₀₃ سودوموناس آئروژینوزا در ژاپن گزارش گردید. الی مقاومتی بر روی پلاسمیدی کونژوگه‌ای قابل انتقال قرار گرفته که توانایی انتقال به همه سویه‌های سودوموناس را دارد. سال ۱۹۹۱ ژن مشابهی از سویه Tn₉₁₀₆ سرشیا مارسنس در اوکازاکی ژاپن شناسایی شد و تحت عنوان IMP-₁ شناخته شد (۶۶). این آنزیم پروتئینی با ۲۴۶ اسید آمینه و وزن مولکولی ۳۰ KD است که بر روی پلاسمید بزرگی (۱۲۰ kb) در داخل اینتگرون کلاس III قرار دارد. از جمله باکتری‌های گرم منفی که مولد IMP-₁ هستند می‌توان به /شریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، سیتروباکتر فروندی، آکالیجنز گزیلواکسیدانس و سویه‌های /سینتو باکتر اشاره کرد (۶۷).

۲-VIM:

این آنزیم دومین خانواده از MBL^۳هاست، از زیر کلاس B₁ و دارای وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون می‌باشد. این آنزیم انتشار و گسترش وسیعی در اروپا، امریکای جنوبی، شرق دور و ایالت متحده دارد. آنزیم VIM-₁ اولین بار از سویه سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستانی در Verona ایتالیا سال ۱۹۹۷ گزارش شده است. این آنزیم بصورت یک پروتئینی با ۲۶۶ آمینو اسید می‌باشد که ژن آن روی اینتگرون کلاس I قرار دارد.

1- Imipenemase

2 - Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase

3-Metallo-Beta-Lactamase

همچنین بعداً VIM-1 از سویه *آکروموباکتر گزلیو/کسیدانس* در همان بیمارستان (Verona) جدا شد که بصورت یک پلاسمید غیرکونزوگه‌ای ۳۰ کیلو دالتونی روی اینتگرون کلاس I قرار داشت. VIM به غیر از ایتالیا از کشورهای دیگر اروپایی و ترکیه نیز گزارش شده است (۶۶).

- SPM^۱:

آنزیم SPM از Sao Paulo برزیل سال ۱۹۹۷، ایزوله شده است. این آنزیم از زیر کلاس B₁ بوده و نسبت به دیگر آنزیم‌های MBL بیشترین شباهت را به IMP دارد. توالی SPM بعلاوه وجود یک قطعه ۲۴ آمینو اسیدی در جایگاهی بعد از سایت فعال آنزیم، کاملاً متفاوت از توالی IMP و VIM بوده و این قطعه بعنوان Loop عمل کرده، باعث تقویت اتصال این آنزیم به بتالاکتام‌ها شده و منجر به هیدرولیز آنها می‌شود. *bla*_{SPM} محتوای ژنتیکی منحصر به فردی دارد SPM با اینتگرون و ترانسپوزون‌ها در ارتباط نبوده، بلکه حضور ISCR₁₀ در مجاورت این ژن است که در حرکت و انتقال آن، دخیل می‌باشد. SPM مانند IMP و VIM قدرت هیدرولیز کلوانیک اسید و آزرئونام را ندارد. سوبسترای SPM پنی سیلین‌ها هستند مانند: پنی سیلین، آمپی سیلین، پیپراسیلین، کاربنی سیلین و سفالوتین (۶۶).

- GIM^۲:

سال ۲۰۰۲، در آلمان پنج سویه *سودوموناس آئروژینوزا* از بیماران مختلف ایزوله شد که حاوی کلاس جدیدی از بتالاکتامازها تحت عنوان GIM بودند، این ایزوله‌ها فقط به پلی‌میکسین حساس بودند. توالی آمینو اسیدی GIM-1 شباهت زیادی به IMP-1 (۴۳/۱ درصد)، IMP-4 (۴۳/۱ درصد) و IMP-6 (۴۳/۵ درصد)، از خانواده VIM: VIM₇ (۳۱/۲ درصد) و VIM_{1,4,5} (۲۸/۸ درصد) و SPM (۲۸ درصد) دارد. مانند اکثر ژن‌های *aml* *bla*_{GIM-1} بر روی اینتگرون کلاس I قرار داشته و توسط پلاسمید کوچکی (۴۵ kb) حمل می‌شود (۶۶).

1- Sao Paulo metallo-β-lactamase

2 -German Imipenemase

- SIM¹:

این آنزیم از سویه/سینتوباکتر بومانی جدا گشته است و از زیر کلاس B₁ می باشد. SIM شباهت زیادی به IMP (۶۹ درصد به IMP₁₂ و ۶۴ درصد به IMP₉) دارد. این آنزیم توانایی هیدرولیز طیف وسیعی از بتالاکتامها مانند پنی سیلینها، به طور محدودی سفالوسپورینهای وسیع الطیف و کارباپنمازها را دارد. ژن *bla*_{SIM} بر روی اینتگرون کلاس I واقع شده است (۶۲).

- AIM^۲:

AIM₁ اولین عضو از زیر گروه جدید MBLها را تشکیل می دهد، این آنزیم از یک زن بومی استرالیا با نقص سیستم ایمنی که دچار عفونت با سودوموناس آئروژینوز/ شده بود، ایزوله شده است. AIM دارای ژنوم ۹۱۵bp می باشد که کد کننده یک پروتئین ۳۰۵ آمینو اسیدی است. این آنزیم از زیر کلاس B₃ است و نسبت به دیگر آنزیمها مثل GIM, SIM, VIM, IMP کمتر شناخته شده است. حضور ISCR₁₀ در مجاورت *bla*_{AIM} مانند SPM، در انتقال این ژن دخیل است (۶۲).

- NDM^۳:

NDM-1 آنزیم جدیدی است که باکتریها را در برابر بسیاری از آنتی بیوتیکها مقاوم می کند. به همین علت، به عنوان یک تهدید کننده و مشکل بهداشت جهانی موجب نگرانیهای شدید در بیمارستانها شده است نام دیگر این آنزیم (Plasmid Encoding Carbapenem Resistant Metallo Beta-lactamase) یا PCM است (۶۸). این آنزیم در سال ۲۰۰۹ در دهلی نو گزارش شده است. این ژن گسترش وسیعی در /شریشیا کلی و کلبسیلا پنومونیه در هند و پاکستان دارد. در اواسط ۲۰۱۰ باکتریهای حامل NDM-1 به کشورهای دیگر نیز گسترش

1- Seoul Imipenemase

2 -Australia Imipenemase

3- New – Delhi – Metallo –beta – lactamase

یافته است مثل ایالت متحده، به احتمال بیشتر این انتقال توسط توریست‌های مسافر صورت می‌گیرد. ژن کدکننده NDM-1 بر روی پلاسمیدهای متحرک قرار دارد. این پلاسمید در کلبسیلا پنومونیه نیز مشاهده شده و قادر است به سویه‌های باکتریایی متفاوت دیگر نیز منتقل شود و باعث انتشار مقاومت دارویی نیز در سرتاسر جهان گردد (۶۹).

- DIM:

این آنزیم برای اولین بار از کشور هلند گزارش شده است. توالی آمینو اسیدی DIM شباهت زیادی به GIM (۵۲ درصد) و IMP (۴۵ درصد) دارد. این آنزیم طیف وسیعی از سفالوسپورین‌ها، کارباپنم‌ها و بطور محدودی آزترئونام را نیز هیدرولیز می‌کند. DIM همراه ژن‌های مقاومتی دیگر بر روی اینتگرون کلاس I قرار گرفته است که این ژن‌ها کدکننده مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها و ضد عفونی کننده‌ها می‌باشند (۷۰).

- KHM:

یک نوع جدید از متالوبتالاکتامازهاست که از سیتروباکتر فروندی در ژاپن، در بیماری که از کاتتر دستگاه ادراری استفاده می‌کرد ایزوله شده است. این آنزیم نیز مانند دیگر آنزیم‌های پلاسمیدی به راحتی قابل انتقال به سایر گونه‌های باکتریایی است. این آنزیم نسبت به اکثر بتالاکتام‌ها مقاوم بوده ولی در برابر کارباپنم‌ها (آزترئونام و کارومونام) حساسیت نشان می‌دهد (۷۱).

۱-۲-۲۱-۱-۳- مه‌ار کننده های متالوبتالاکتامازها

در سال ۱۹۸۰ آموکسی سیلین-کلاولانات معرفی شد این دارو، حاوی یک بتالاکتام (آمپی سیلین) و مه‌ارکننده بتالاکتامازی (کلاولانیک اسید) است. و در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به ESBL مورد استفاده قرار می‌گیرد. مه‌ار کننده‌هایی از این قبیل و یا مه‌ار کننده‌هایی مثل سولباکتام و تازوباکتام که برای مه‌ار

ESBL ها بکار می‌رود، در مورد MBL ها کاربردی ندارد. بلکه این آنزیم‌ها توسط شلاته کننده‌های فلزی از قبیل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)^۱، سدیم مرکاپتو استیک اسید (SMA)^۲، ۲ - مرکاپتو پروپیونیک اسید (MPA)^۳ و گروه تیول مهار می‌شوند (۶۶).

۱-۲-۲۱-۴- تشخیص متالوبتالاکتامازها

روش های موجود برای تشخیص متالوبتالاکتامازها شامل روش های فنوتیپی^۴ و روش های ژنوتیپی^۵ می‌باشد (۶۶).

۱-۲-۲۱-۴-۱- شناسایی فنوتیپی متالوبتالاکتامازها

متاسفانه روش های فنوتیپی استاندارد برای تشخیص متالوبتالاکتامازها وجود ندارد. تست‌های معتبر برای تشخیص احتمالا وابسته به ژن‌هایی است که توسط سودوموناس یا تعدادی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه‌ها حمل می‌شود و میزان مقاومت را نشان می‌دهد (۶۶).

از روش های فنوتیپی که برای تشخیص MBL ها به کار می‌رود، می‌توان به روش دیسک دیفیوژن آگار، MIC، Hodge test، DDST Method، Combined Disk و E-test اشاره کرد.

لیکن پر کاربردترین روش های فنوتیپی مورد استفاده، اجرای غربالگری پلیت به روش دیسک دیفیوژن و MIC، همچنین تست‌های تاییدی مانند دیسک ترکیبی و E-test می‌باشد (۶۶).

2-Ethylen diamino tetraacetic acid

3- Sodium mercaptoacetic acid

4-2- Mercaptopropionic acid

4 -Clinical microbiology

5 -Molecular detection

۱-۲-۲۱-۱-۴-۱-۱- تست‌های غربالگری:

۱-MIC:

حداقل غلظتی از دارو که سبب ممانعت از رشد باکتری در محیط شده و به عنوان حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد نامیده می‌شود. تست براث دایلوژن باید در محیط مولر هینتون براث پس از تلقیح سوسپانسیون میکروبی استاندارد و آنتی بیوتیک مورد نظر صورت گیرد. پس از ۱۶ الی ۱۸ ساعت انکوباسیون، در صورتی ایزوله‌های سودوموناس مولد MBL در نظر گرفته می‌شود که میزان MIC برای سیپروفلوکسازین و سفپیم $4\mu\text{g/ml}$ >، سفتازیدیم $32\mu\text{g/ml}$ > و برای ایمپنم $16\mu\text{g/ml}$ > باشد (۷۲).

-روش دیسک دیفیوژن آگار:

تست غربالگری دیسک دیفیوژن باید بر روی محیط مولر هینتون آگار که توسط سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت نیم مک فارلند تلقیح شده است، صورت گیرد و پس از ۱۶ الی ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی گراد، قرائت شود. دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورد نیاز و همچنین قطر هاله عدم رشد ارگانیسم‌ها در برابر هر یک از دیسک‌ها طبق استانداردهای CLSI صورت می‌گیرد. متعاقب این روش تست دیسک ترکیبی^۲ انجام می‌گیرد (۷۳).

۱-۲-۲۱-۱-۴-۲- تست‌های تاییدی:

-تست دیسک ترکیبی:

این تست متعاقب، آزمایش دیسک دیفیوژن انجام می‌گیرد. در این روش برای تشخیص وجود MBLها از پلیتی که حاوی ایمپنم با یا بدون EDTA است، استفاده می‌گردد. سویه‌های مقاوم به ایمپنم (هاله عدم رشد کمتر از ۱۶mm) جهت بررسی تولید متالو بتالاکتاماز (MBL) انتخاب می‌شوند، افزایش منطقه ممانعت از رشد

1- Minimal Inhibitory Concentration

2 -Combined Disk

دیسک IPM-EDTA به مقدار $\leq 7mm$ نسبت به دیسک ایمی پنم به تنهایی به عنوان متالوبتالاکتاماز مثبت در نظر گرفته می شود (۷۳).

E- test-

در این تست از نوارهای AB BioDisk, Solna, Sweden استفاده می شود. این نوارها از دو نیمه تشکیل شده، در یک نیمه (IP) گرادیانی از غلظت های مختلف ایمی پنم ($4-256 \mu g/ml$) و در نیمه دیگر (IPI) گرادیانی از غلظت های مختلف ایمی پنم همراه با غلظت ثابتی از EDTA ($1-64 \mu g/ml$) قرار دارد. تفسیر E- test mbl به صورت کاهش سه رقت یا بیشتر، MIC ایمی پنم در حضور EDTA یا اگر نسبت IPMIC به IPI بزرگتر یا مساوی ۸ باشد بیانگر تولید متالوبتالاکتاماز می باشد. همچنین اگر ناحیه اضافی به نام (Phantom Zone) بین قسمت های IP و IPI مشاهده شود و یا هاله عدم رشد IP یا IPI در انتهای باریک شونده بیضی مهار دچار تغییر شکل گردند بدون در نظر گرفتن نسبت IP MIC به IPI مولد متالوبتالاکتاماز تلقی می گردد (۷۵).

۱-۲-۲۱-۱-۴-۲- شناسایی ژنوتیپی متالوبتالاکتامازها

روش های ژنتیکی که برای تشخیص MBLها مورد استفاده قرار می گیرد، همانند روش های استفاده شده برای شناسایی بتالاکتام های وسیع الطیف می باشد. از جمله این روش ها می توان به روش PCR، DNA پروب و توالی یابی اشاره کرد (۶۶).

PCR^۱ -

واکنش زنجیره پلی مرز اولین بار در اواسط دهه ۱۹۸۰ توسط کری مولیس ابداع گردید که مجموعه ای از واکنش های بیوشیمیایی است که طی آن قطعه مشخصی از DNA به طور اختصاصی و با حساسیت فوق العاده به تعداد زیادی تکثیر می گردد. به این ترتیب می توان قطعه کوچکی از یک ژنوم بزرگ را که قابل دستیابی نیست

1 - Polymerase chain reaction

به طور انبوه تولید و استفاده کرد. این فرایند، کاربردهای زیادی در تحقیقات بیولوژیکی از جمله تشخیص مولکولی، تشخیص سریع عوامل بیماریهای عفونی، تشخیص قبل از تولد امراض ژنتیکی، تجزیه و تحلیل مولکولی نمونه های تاریخی و صدها مورد دیگر دارد. ساده ترین و رایج ترین روش مولکولی مورد استفاده جهت تعیین وجود آنزیم متالوبتالاکتاماز متعلق به یک خانواده استفاده از PCR می باشد که با استفاده از پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی اختصاصی برای هر ژن متالوبتالاکتاماز انجام می گیرد. انواع مختلفی از PCR برای شناسایی MBLها مورد استفاده قرار می گیرد (۶۶).

- هیبریداسیون به وسیله پروب های DNA:

این روش برای هر ژن اختصاصی است، برای هر ژن یک پروب نیاز است در این روش بین انواع مختلف ژنها نمی توان افتراق قائل شد. پروب های الیگونوکلئوتیدی نشان دار شده با بیوتین یا رادیوایزوتوپ جهت شناسایی جهش های نقطه ای، تحت شرایط هیبریداسیون طراحی شدند (۶۶).

۱-۲-۲۱-۵- درمان متالوبتالاکتامازها

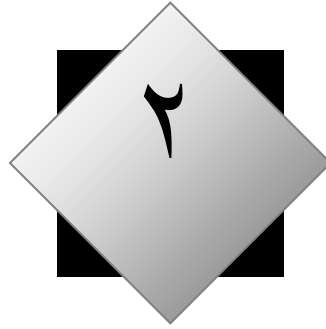
ژن های کدکننده آنزیم های MBL بیشتر روی پلاسمیدها قرار دارند. از باکتری هایی که حامل این ژن های پلاسمیدی هستند، می توان به *سودوموناس آئروژینوزا* و *اسینتو باکتر* اشاره کرد و به مقدار کمتر گروه *انتروباکتریاسه* نیز دارای این ژن ها می باشند. این باکتری ها به علت دارا بودن بتالاکتامازهای وسیع الطیف، به اکثر کلاس های آنتی بیوتیکی مقاومت طبیعی پیدا کردند. سویه های مولد MBL، به دلیل پیوستگی ژنتیکی، به اکثر خانواده های آنتی بیوتیکی از جمله سولفانامیدها، کینولون ها و آمینوگلیکوزیدها مقاومت نشان می دهند.

کاربانم ها از جمله ایمی پنم و مروپنم از مهمترین آنتی بیوتیک های ضد میکروبی هستند که برای درمان عفونت های ناشی از باکتری های مولد MBL به کار می روند. اما به دلیل افزایش مقاومت برخی باکتری ها به ایمی پنم و مروپنم، امروزه بیشتر از آزترئونام با دوزهای بالا استفاده می شود که داروی موثری بر علیه این

باکتری‌ها محسوب می‌شود. مهارکننده‌های متالو آنزیمی که در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می‌گیرند در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها کاربردی ندارند. همچنین برای درمان این عفونت‌ها از پلی‌میکسین B و کلسیتین نیز می‌توان استفاده کرد (۶۲،۶۶).

۱-۲-۲۱-۶- اپیدمیولوژی متالوبتالاکتامازها

متالوبتالاکتامازهای پلاسמידی اولین بار از سویه GN₁₇₂₀₃ سودوموناس *آئروژینوزا* در ژاپن سال ۱۹۹۸ شناسایی گردید. آنزیم IMP انتشار و گسترش وسیعی در شرق دور بخصوص ژاپن، اروپا (ایتالیا)، امریکای جنوبی دارد. امروزه ژن‌های VIM گسترش و پراکندگی وسیعی در سراسر دنیا دارند و باعث مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی شده‌اند. این آنزیم بیشتر در کشورهای نظیر ایتالیا، کره جنوبی، یونان، ژاپن و تایوان مشاهده می‌شود. SPM از برزیل و امریکای جنوبی و GIM از آلمان گزارش شده است (۶۲،۶۶).



فصل دوم:

بررسی متون

۲-۲-مروری بر متون

Ana C - و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که از ۴۳ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کارباپنم (ایمی‌پنم و مروپنم) بدست آمده از ۱۲ بیمارستان مختلف برزیل، همه این ایزوله‌ها نسبت به کلیستین (۱۰۰ درصد) حساس بودند. همچنین بیشترین حساسیت را نسبت به پیپراسیلین/ تازوباکتام (۳۹/۵ درصد)، آرترونام (۳۰/۲ درصد) و جنتامایسین با (۲۷/۹ درصد) داشتند. کمترین فعالیت را فلوروکینولون‌ها، گتی فلوکساسین با (MIC₉₀ > 8 mg/L; 11.6% susceptible) و سیپروفلوکساسین با (MIC₉₀ > 4 mg/L; 11.6% susceptible) داشتند. با استفاده از روش PCR ۱۵ ایزوله (۳۴/۹ درصد) دارای ژن bla_{SPM} بودند (۷۷).

Park - و همکاران در سال ۲۰۰۳ در کره از ۹۹ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمی‌پنم، ۳۱ ایزوله با روش‌های فنوتیپی MBL مثبت بودند در حالی که با روش PCR، ۲۹ ایزوله حاوی ژن bla_{VIM} و ۲ ایزوله حاوی ژن bla_{IMP} گزارش کردند (۷۸).

- طی مطالعاتی که Arunagiri و همکاران در هند بر روی ۶۷ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از نمونه‌های مختلف بیمارستانی انجام دادند. بوسیله روش دیسک ترکیبی نشان دادند که ۶۲/۷ درصد ایزوله‌ها مقاوم به ایمی‌پنم و ۷۰/۱ درصد ایزوله‌ها مقاوم به مروپنم هستند. همچنین ۷۰/۱ درصد ایزوله‌ها مولد MBL بودند. از میان این ایزوله‌ها ۴۱ سویه (۶۱/۱ درصد) حامل ژن bla_{VIM} و ۲ سویه (۳ درصد) حامل ژن bla_{IMP} بودند (۷۹).

Sader - و همکاران در Sao Paulo برزیل در سال ۲۰۰۵، ۳۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا را مورد بررسی قرار دادند. ۲۰ ایزوله (۵۵/۶ درصد) دارای ژن bla_{SPM} و ۱۱ ایزوله (۳۰/۶ درصد) حاوی ژن bla_{VIM} و ۳ ایزوله (۸/۳ درصد) دارای ژن bla_{IMP} بودند (۸۰).

- Pitout و همکاران در پاریس در بررسی که روی ۲۴۱ نمونه سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمی‌پنم که طی سال‌های ۲۰۰۴ - ۲۰۰۲ جمع‌آوری شده بود، انجام دادند. با استفاده از تست‌های فنوتیپی ۱۱۰ (۴۶ درصد) ایزوله مولد MBL بودند، در حالیکه با استفاده از تست ژنوتیپی (PCR) ۱۰۷ (۴۵ درصد) ایزوله مولد MBL بودند. از بین این ایزوله‌ها ۱۰۳ (۴۳ درصد) حامل ژن *blaVIM* و ۴ (۲ درصد) حامل ژن *blaIMP* بودند (۸۱).

- در مطالعه Altouparlak و همکاران در ترکیه از میان ۱۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به عفونت‌های سوختگی، ۳۰/۸ درصد آنها به ایمی‌پنم مقاوم بودند که از میان آنها ۲۱ (۵۶/۸ درصد) ایزوله به عنوان مولد متالوبتالاکتامازها شناسایی شدند و تمامی ایزوله‌های تولیدکننده MBLs دارای مقاومت چندگانه بودند (۸۲).

- Ellington و همکاران با بررسی ۶۰ ایزوله کلینیکی در سال ۲۰۰۷ در لندن، با استفاده از روش Multiplex PCR نشان دادند که ۱۱ ایزوله واجد ژن *blaIMP* و ۴۹ ایزوله واجد ژن *blaVIM* است. ۱۱ ایزوله‌ای که واجد ژن *blaIMP* بودند شامل: ۸ سویه سودوموناس، ۲ سویه کلبسیلا، ۱ سویه اسینتوباکتر و از ۴۹ ایزوله‌ی واجد ژن *blaVIM*، ۴۸ سویه سودوموناس و ۱ سویه کلبسیلا بودند. ایزوله‌ای که واجد ژن *blaSPM* و *blaSIM* باشد شناسایی نشد (۸۳).

- در کشور تایوان سال ۲۰۰۸ مطالعه کامل و مفصلی در مورد آنزیم‌های متالوبتالاکتامازها انجام شده است. در این مطالعه ژن‌های *blaIMP*، *blaVIM*، *blaSPM*، *blaSIM*، *blaGIM* مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت مشخص شد که *blaVIM* 2,3,11 در میان ایزوله‌ها دارای بیشترین فراوانی می‌باشد. ژن‌های *blaSIM*، *blaSPM*، *blaGIM* شناسایی نشدند. بیشترین ایزوله‌های حامل ژن‌های متالوبتالاکتامازها سودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتریومانی بودند (۸۴).

- Camargo و همکاران در برزیل با مطالعه‌ای که روی ۴۷ سویه سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چندگانه داشتند. نشان دادند که با استفاده از روش های فنوتیپی ۱۳ ایزوله مولد MBL هستند. این در حالی است که با استفاده از تست PCR ۱۴ ایزوله مولد MBL بودند (۸۵).

- در کشور ژاپن سالانه تمامی سویه‌های مقاوم به کاربایم مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. در این کشور دو نوع کاربایماز IMP و VIM گزارش شده‌اند اما تاکنون از سایر انواع آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز گزارشی نشده است (۸۶).

- Gomes و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی شیوع آنزیم‌های MBL در برزیل پرداختند. نتایج بررسی نشان داد که از ۲۳۸ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از خون، با استفاده از تست‌های فنوتیپی ۷۷ درصد ایزوله‌ها MBL مثبت بودند. در حالی که استفاده از تست PCR، ۳۰ درصد MBL مثبت نشان داده شدند. از ۶۹ (۳۴/۵ درصد) ایزوله‌ای که مقاوم به ایمپنم بودند، ۸۱ درصد از ایزوله‌ها حامل SPM₁ بوده و ۱۹ درصد نیز حامل VIM₂ بودند (۸۷).

- طی مطالعاتی که صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ۱۰۸ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از بیمارستان‌های مختلف شهر اراک انجام دادند، ۴۰ سویه مقاوم به ایمپنم بودند. درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمیکاسین، ایمپنم، جنتامیسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۱۱/۱٪، ۳۷٪، ۱۵/۷٪، ۲۹/۶٪ و ۱۷/۶٪ بود (۸۸).

- در مطالعه دیگری که توسط فولادی سال ۲۰۱۱ در زنجان بر روی ۱۱۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی انجام گرفت درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، آمیکاسین، تتراسیکلین، سفوتاکسیم، جنتامیسین، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم به ترتیب برابر با ۹۲/۷٪، ۱۷/۳٪، ۸۶/۴٪، ۴۳/۶٪، ۲۵/۵٪، ۲۰/۹٪، ۲۰/۹٪ بود (۸۹).

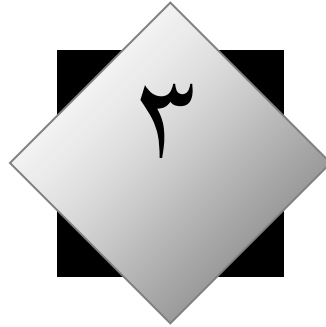
در مطالعه‌ای که صادری و همکاران سال ۲۰۱۰ روی ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا انجام دادند، درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمیکاسین، جنتامایسین، سفنازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۷۳٪، ۸۶٪، ۷۳٪، ۵۵٪ بود (۹۰).

- خسروی و همکاران در اهواز طی تحقیقاتی که بر روی ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از عفونت‌های سوختگی انجام دادند. همه‌ی ایزوله‌های مقاوم به ای‌می‌پنم با استفاده از متد E-test، MBL مثبت در نظر گرفته شدند، نتایج بدست آمده نشان داد که ۸ (۵/۱۹٪) ایزوله‌ها دارای ژن *bla_{VIM}* بود و ایزوله‌ای که حاوی ژن *bla_{IMP}* باشد، شناسایی نشد (۹۱).

- شاه چراغی و همکاران در بیمارستان امام خمینی تهران ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا را که طی سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۷ جمع‌آوری شده بود را از لحاظ وجود ژن‌های *bla_{SPM}*، *bla_{IMP}*، *bla_{VIM}* توسط PCR مورد بررسی قرار دادند. که فقط ژن *bla_{VIM}* شناسایی شد و سایر ژن‌ها یافت نشدند (۹۲).

- میهنی و همکاران با مطالعه‌ای که بر روی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بخش سوختگی بیمارستان طالقانی اهواز انجام دادند. با روش E-test نشان دادند که از بین ۱۰۰ نمونه بالینی جدا شده، ۴۱ نمونه دارای مقاومت به ای‌می‌پنم بودند. ۸ ایزوله (۵/۱۹ درصد) حاوی ژن *bla_{VIM}* بودند و ایزوله‌ای که حاوی ژن *bla_{IMP}* باشد، شناسایی نشد (۷۵).

- بررسی که در سال ۲۰۰۷ توسط شکیبایی و همکاران بر روی ۱۲۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بخش سوختگی بیمارستان شفا شهر کرمان انجام شد، هیچ ایزوله مولد متالوبتالاکتاماز با روش E-test، گزارش نگردید (۹۳).



فصل سوم:

مواد و روش‌ها

- اهداف پژوهش
- تعریف واژه‌ها
- محدودیت‌های پژوهش
- نوع پژوهش
- جامعه پژوهش
- واحد پژوهش
- متغیرها
- روش انتخاب نمونه
- روش اجرای پژوهش

۳-۱-اهداف پژوهش

۳-۱-۱-اهداف کلی طرح

شناسایی ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزای مولد متالوبتالاکتامازهای IMP، VIM و SPM با روش PCR

۳-۱-۲-اهداف جزئی طرح

- تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه‌های بالینی (نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفودوکسیم، سفپیم، آمیکاسین، آزترئونام، پلی میکسین، ای‌می‌پنم، مروپنم، تتراسیکلین، جنتامایسین، پیپراسیلین - تازوباکتام، پیپراسیلین، سف‌تازیدیم، سف‌تاکسیم، سی‌پروفلوکساسین، لووفلوکساسین، افلوکساسین، توبرامایسین، تیکارسیلین و کاربنی سیلین).
- تعیین ایزوله‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR).
- بررسی فنوتیپی متالوبتالاکتامازها در سویه‌های مقاوم با استفاده از روش دیسک ترکیبی.
- تعیین فراوانی ژن‌های bla_{IMP} ، bla_{VIM} و bla_{SPM} در ایزوله‌های مولد MBL.

۳-۱-۳ تعریف واژه‌ها

MBL: Metallo-Beta-Lactamase، آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز که قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز منوباکتام‌ها هستند.

۳-۱-۴- محدودیت‌های طرح

انجام این تحقیق با مشکلاتی مانند از بین رفتن سویه‌ها، عدم دسترسی سریع به سویه‌های استاندارد و کمبود سویه‌های بالینی در طی مراحل متعدد همراه است.

۳-۱-۵- هدف از تحقیق حاضر

هدف از این تحقیق، بررسی فراوانی متالوبتالاکتامازی IMP, SPM VIM در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه‌های بالینی بیمارستان‌های منتخب شهر های قزوین و تهران با روش PCR بود.

۳-۲- نوع پژوهش

پژوهش اخیر یک مطالعه توصیفی- مقطعی (میزان شیوع Prevalence Rate) می‌باشد.

۳-۳- جامعه پژوهش

نمونه‌های کلینیکی مختلف (شامل نمونه های ادرار، خون، زخم، تراکتال، برونکو آلوئولار لاواژ و خلط) از بیماران بستری یا مراجعه کننده به بیمارستان‌های مختلف شهر های تهران و قزوین به صورت مقطعی- تصادفی جمع آوری گردید. تعداد ۳۵۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های کلینیکی بطور تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت تا میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی (خصوصا مقاومت متالوبتالاکتامازی) مشخص گردد. سپس در سویه‌های مقاوم (فنتویپی) حضور ژن‌های

*bla*_{SPM} و *bla*_{IMP-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-1} مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۴- واحد پژوهش

۳۵۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوز/ی جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های شهرهای تهران و قزوین.

۳-۵- متغیرها

سویه‌های سودوموناس آئروژینوز/ی: متغیر زمینه‌ای-پیوسته اسمی

IMP, SPM, VIM: متغیر زمینه‌ای- پیوسته اسمی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی: متغیر زمینه‌ای-پیوسته اسمی

۳-۶- روش انتخاب نمونه

حجم نمونه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شده است:

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2} \times P \times (1 - P)}{d^2} = \frac{1.96^2 \times 0.35 \times 0.65}{0.05^2} \cong 350$$

۳-۶- روش اجرای پژوهش

۳-۶-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها

جهت انجام این مطالعه در مجموع ۳۵۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوز/ی از بیمارستان امام حسین (ع) شهر تهران و بیمارستان‌های بوعلی، کوثر، قدس و شهید رجایی شهر قزوین جمع‌آوری گردید. باکتری‌ها از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون، ترشحات تنفسی، مدفوع و سایر نمونه‌ها جدا شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه

مجدداً تعیین هویت گردیدند. ایزوله‌های تأیید شده، در فریزر ۷۰ - درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایشات بعدی نگه‌داری شدند.

۳-۶-۲- شناسایی و تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده

جهت تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده، از تست‌های بیوشیمیایی مختلف استفاده شد. این تست‌ها شامل رشد در محیط مک‌کانکی آگار، تست اکسیداز، واکنش در محیط ¹TSI، تست ²OF، بررسی تحرک، رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و تولید پیوسیانین در محیط مولر هینتون آگار بود.

۳-۶-۳- محیط کشت‌های مورد نیاز

محیط‌های به کار رفته جهت تعیین هویت سودوموناس آئروژینوزا عبارتند از:

محیط مک‌کانکی آگار، اکسیداتیو-فرمانتاتیو، تریپل شوگر آیرون آگار، SIM و مولر هینتون آگار.

۳-۶-۳-۱- محیط مک‌کانکی آگار

محیط مک‌کانکی آگار برای بررسی مصرف قند لاکتوز توسط باکتری‌ها به کار می‌رود. این محیط حاوی پپتون، نمک صفرا، لاکتوز، کلرید سدیم و نوترال رد می‌باشد.

۳-۶-۳-۲- محیط OF

این محیط برای تشخیص نوع مصرف قند در باکتری‌های گرم منفی میله‌ای غیر تخمیری مورد استفاده قرار می‌گیرد.

1 -Triple Sugar Iron Agar
2 -Oxidative – Fermentation

۳-۶-۳-۳ محیط TSI

محیط TSI برای تشخیص مصرف قندهای گلوکز، لاکتوز، ساکاروز و همچنین تولید گاز سولفید هیدروژن توسط باکتری به کار می‌رود.

۳-۶-۳-۴ محیط SIM

محیط SIM، محیطی نیمه جامد است و برای تعیین تولید SH₂، اندول و حرکت (motility) به کار می‌رود.

۳-۶-۴- نگهداری ایزوله‌ها

پس از تأیید نهایی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف حدود ۱ الی ۴ کلنی به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری حاوی محیط تریپتی کیس سوی براث واجد ۲۰ درصد گلیسرول منتقل و پس از حل نمودن کلنی‌ها در محیط مزبور، میکروتیوب‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس با دیدن کدورت محیط که ناشی از رشد باکتری‌ها می‌باشد، میکروتیوب‌ها را ابتدا به مدت ۱ الی ۴ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس جهت نگهداری بلند مدت به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل نمودیم (نگهداری در یخچال قبل از فریز کردن نمونه‌ها جهت جلوگیری از شوک سرمایی مفید می‌باشد). در طی مدت زمان نگهداری ایزوله‌ها تا شروع مرحله تشخیص مولکولی، به صورت تصادفی به فاصله هفتگی، ماهانه و سه ماهه تعدادی از نمونه‌ها از فریزر خارج و بعد از دفریز شدن در محیط MHB دوباره کشت داده شدند تا اطمینان حاصل شود در طی مدت زمان فریز شدن باکتری، از قدرت رشد کنندگی آنها کاسته نشده باشد.

۳-۶-۵- بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش Disk Diffusion

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا توسط تست آنتی‌بیوگرام (دیسک دیفیوژن) انجام شد که متداول ترین تست مورد استفاده جهت بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی آگار می باشد. این تست بر اساس انتشار در دیسک و بر اساس دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (CLSI) به استفاده از ۱۸ دیسک آنتی بیوتیک مختلف انجام شد. از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 جهت کنترل کیفی آزمون استفاده شد.

۳-۶-۵-۱- مواد و وسایل مورد نیاز تست آنتی بیوگرام

- محیط کشت مولر هینتون آگار
 - دیسک‌های آنتی بیوتیکی (شرکت MAST، انگلستان):
 - آمیکاسین (۳۰ میلی گرم) ، آزترئونام (۳۰ میلی گرم) ، ایمپنم (۱۰ میکرو گرم)، جنتامایسین (۱۰ میکرو گرم)، سفوتاکسیم (۱۰ میکرو گرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکرو گرم)، سفودوکسیم (۱۰ میکرو گرم)، سفپیم (۳۰ میکرو گرم) ، پلی میکسین (۱۰ میکرو گرم)، مروپنم (۱۰ میکرو گرم)، پپراسیلین - تازوباکتام (۱۱۰ میکرو گرم)، پپراسیلین (۱۰۰ میکرو گرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکرو گرم)، لووفلوکساسین (۵ میکرو گرم)، افلوکساسین (۱۰ میکرو گرم)، توبرامایسین (۱۰ میکرو گرم)، تیکارسیلین (۱۰ میکرو گرم) و کاربنی سیلین (۱۰ میکرو گرم)
- به اساس جداول استاندارد CLSI.

- اسید سولفوریک و کلرید باریوم جهت تهیه نیم‌مک فارلند.

- سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853

- پلیت‌های یکبار مصرف ۱۰ سانتی متری

- سواپ پنبه‌ای استریل و پنس

▪ لوله آزمایش حاوی ۱ تا ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل

▪ لوله حاوی استاندارد نیم مک فارلند

▪ خط کش مخصوص اندازه گیری قطر هاله عدم رشد

۳-۶-۵-۲- تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند، از کلنی های تازه (۲۴-۱۸ ساعته) و خالص سودوموناس آئروژینوزا در لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل تلقیح کرده، سپس با مقایسه کدورت آن با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه نمودیم. جذب نوری یا OD این سوسپانسیون در طول موج ۶۲۵ نانومتر بایستی حدود ۰/۰۸ تا ۰/۱ باشد.

۳-۶-۵-۳- کنترل کیفی دیسک ها

تمامی دیسک های آنتی بیوتیکی قبل از استفاده برای آزمایش، از لحاظ کیفیت کنترل شدند. برای این منظور ابتدا سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک فارلند) به روش مستقیم از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853 تهیه شد، سپس توسط سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت خطی داده شد. در نهایت، دیسک ها با فاصله ۲۲ میلی متر از یکدیگر و ۱۶ میلی متر از جداره پلیت بر روی محیط قرار داده شدند.

۳-۶-۵-۴- روش کار تست آنتی بیوگرام

جهت انجام تست آنتی بیوگرام ابتدا سوسپانسیون باکتریایی معادل غلظت نیم مک فارلند تهیه کردیم. به این صورت که چند کلنی خالص سودوموناس آئروژینوزا را در لوله های ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی تلقیح کرده، سپس لوله ها را در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم تا به کدورت مورد نظر برسند (کدورت معادل نیم مک فارلند). در مرحله بعد به کمک سوآپ پنبه ای کشت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار انجام دادیم. پس از گذشت ۱۵ دقیقه از کشت، دیسک های آنتی بیوتیکی بر روی محیط کشت قرار داده شدند و

بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از قرار دادن دیسک‌ها، پلیت‌ها در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت انکوبه گردید. قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه‌گیری و تفسیر آن با توجه به استانداردهای CLSI انجام گرفت و بر حسب قطر هاله عدم رشد، ایزوله‌ها به ۳ گروه حساس، حد متوسط و مقاوم تقسیم‌بندی شدند.

۳-۶-۶- آزمایش دیسک ترکیبی جهت تشخیص فنوتیپی متالوبتالاکتامازها

۳-۶-۶-۱- وسایل و مواد لازم

- آنتی‌بیوتیک ای‌می‌پنم
- محلول EDTA (نیم مولار)
- محلول استاندارد نیم مک‌فارلند
- سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853
- پلیت‌های یکبار مصرف ۱۲ سانتی‌متری
- سوآپ‌های پنبه‌ای استریل و پنس
- لوله‌های آزمایش حاوی ۱ تا ۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل
- خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد

۳-۶-۶-۲- روش کار

جهت تشخیص فنوتیپی سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز، از دیسک ای‌می‌پنم به تنهایی و همراه با مهارکننده EDTA (۱۰ میکرو گرم) استفاده شد. در این مرحله ایزوله‌هایی که مقاوم به ای‌می‌پنم بودند جهت انجام تست دیسک ترکیبی انتخاب شدند. پس از تهیه محیط مولر هینتون آگار، سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند در محیط مذکور تلقیح شد و پس از ۱۵ دقیقه، دیسک آنتی‌بیوتیکی ای‌می‌پنم به تنهایی و ای‌می‌پنم + EDTA (۳۰-۱۰ میکرو گرم) را به فاصله حداقل ۲/۵ سانتی متر از یکدیگر روی محیط قرار دادیم و پس از ۲۴

ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. چنانچه هاله عدم رشد اطراف دیسک ایمی‌پنم همراه EDTA بیشتر و یا مساوی ۷ میلی‌متر، نسبت به دیسک ایمی‌پنم تنها باشد سویه مورد بررسی را می‌توان طبق استاندارد CLSI به عنوان مولد آنزیم متالوبتالاکتاماز در نظر گرفت.

۳-۶-۶-۳- تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) با روش E-test

تعیین حداقل غلظت مهاری به روش E-test طبق توصیه CLSI برای آنتی بیوتیک ایمی پنم انجام گرفت. در این آزمون مطابق با جدول کنترل کیفی CLSI از سویه استاندارد برای انجام کنترل کیفی آزمایش استفاده شد. تعیین MIC با روش E-test برای ایمی پنم مطابق با دستورالعمل CLSI به شکل زیر انجام و تفسیر شد (۷۳).

۳-۶-۶-۴- آماده کردن سوسپانسیون میکروبی و تلقیح آن

ابتدا از نمونه ها یک سوسپانسیون میکروبی دارای کدورت معادل استاندارد نیم مک فارلند ($10^8 \times 1-2$) تهیه گردید سپس به میزان ۱:۱۰ با سالین رقیق شد که تقریباً معادل ($10^7 \times 1$) است سپس از این سوسپانسیون باکتریایی بعد از مخلوط کردن مقدار ۲ میکرولیتر با استفاده از میکروپیپت برداشته و بر روی محیط مولر هیتون آگار قرار دادیم. تلقیح نهایی روی آگار تقریباً معادل 10^4 CFU در هر نقطه می باشد. کلیه مراحل در شرایط کاملاً آسپتیک انجام شد. بعد از تلقیح نمونه ها پلیت ها در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۶-۲۰ ساعت انکوبه شد کلیه مراحل فوق بر روی یک پلیت فاقد آنتی بیوتیک بعنوان کنترل مثبت نیز انجام گرفت. هم چنین در هر پلیت خانه ای برای سویه استاندارد و کنترل منفی که تلقیح میکروبی در آن انجام نمی شود در نظر گرفته شد.

۳-۶-۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

همه ایزوله های مولد متالو بتالاكتاماز از نظر حضور ژن های *blaSPM* و *blaIMP-2*, *blaIMP-1*, *blavIM-2*, *blavIM-1* با استفاده از پرایمر های اختصاصی (جدول ۱) بررسی شدند. سپس شرایط واکنش PCR جهت تکثیر تک تک ژن ها با سویه استاندارد بهینه سازی شد. در نهایت، ایزوله های بالینی به منظور شناسایی هر سه ژن ارزیابی شدند.

۳-۶-۷-۱- استخراج DNA:

مواد و وسایل مورد نیاز

- سمپلر و سر سمپلر
 - میکروتیوب ۱/۵
 - شیکر (shaker)
 - میکروسانتریفیوژ
 - انکوباتور ۳۷ درجه
 - بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد
 - نانو دراپ
 - مراحل استخراج DNA با استفاده از روش boiling به شرح ذیل انجام گرفت:
۱. برای استخراج DNA به روش boiling نیاز به کلنی هایی از کشت تازه (۲۴ ساعته) داریم، به این منظور نمونه هایی که در آزمون فنوتیپی از نظر تولید متالو بتالاكتامازها مثبت شدند برای استخراج

DNA کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و رشد ایزوله های مورد نظر آماده استخراج شدند.

۲. ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف ۱/۵ میلی لیتر حاوی ۲۰۰۸ آب مقطر استریل حل کردیم.

۳. با استفاده از شیکر آن قدر نمونه ها را shake می کنیم تا اینکه کاملاً حل شوند.

۴. ویال ها را به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه، داخل بن ماری جوش (۱۰۰ درجه سانی گراد)، قرار دادیم به طوری که سطح آب جوش دو سوم ویال را در بر گیرد.

۵. سپس ویال ها را به مدت ۱۰-۵ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰ g (با استفاده از سانتریفوژ اپندورف)، سانتریفوژ کردیم و محلول رویی (سوپرناتانت) ویال ها که حاوی DNA می باشد، برای انجام واکنش PCR به اپندورف استریل منتقل شد.

استخراج به این روش به صورت روزانه انجام گرفت و برای حصول به نتایج بهتر در PCR، DNA استخراج شده ذخیره نمی شد.

۳-۶-۷-۲- ارزیابی کمی DNA استخراج شده

با روش UV اسپکتروفتومتری غلظت و خلوص نمونه DNA استخراج شده به کمک جذب نوری در طول موج ۲۶۰ nm و ۲۸۰ با استفاده از رابطه زیر بدست می آید.

ضریب خاموشی DNA \times عکس رقت \times OD قرائت شده در ۲۶۰ نانومتر = ($\mu\text{g/ml}$) مقدار DNA

ضریب خاموشی DNA، ۵۰ می باشد. ابتدا نمونه DNA استخراج شده را به نسبت ۵ به ۴۹۵ میکرولیتر با آب مقطر استریل رقیق کرده و سپس میزان جذب نوری یا OD آن را در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری کردیم.

۳-۶-۷-۳- مواد مورد نیاز جهت انجام PCR:

- dNTP_s (نوکلئوتیدها)
- پرایمر پیشرو (F) و پیرو (R)
- DNA الگو
- Taq DNA Polymerase
- آب مقطر دیونیزه
- بافر ۱۰x-PCR

۳-۶-۷-۴- پروسه انجام واکنش PCR

۳-۶-۷-۴-۱- مواد و وسایل مورد نیاز

- ست سمپلر و سر سمپلر آبی، زرد، کریستالی
- میکروتیوب ۲۰۰ μl-۵۰۰ μl
- دستگاه ترموسایکلر
- ظرف یخ (تمام مراحل تهیه سوسپانسیون اصلی و افزودن DNA الگو و آنزیم Taq DNA polymerase باید بر روی یخ انجام گیرد).
- آب مقطر دیونیزه
- سویه‌های کنترل مثبت
- پرایمرهای اختصاصی
- Master Mix

۳-۶-۸- تکثیر آنزیم‌های متالوبتالاکتامازی IMP, VIM و SPM

۳-۶-۸-۱- پرایمرهای مورد استفاده

پرایمرهای مورد استفاده در PCR به صورت کاملاً اختصاصی و مکمل ناحیه مورد نظر از DNA هدف طراحی می شوند. توالی پرایمرهای مورد استفاده بر اساس مطالعه Shibata و همکارانش بوده و توسط شرکت ماکروژن کره سنتز شده است. توالی و اندازه قطعات تکثیر شده توسط این پرایمرها در جدول ۳-۱ ذکر شده است (۸۳).

جدول ۳-۱- پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی	اندازه محصول
<i>bla</i> _{IMP-1} F1	ACCGCAGCAGAGTCTTTGCC	۵۸۷bp
<i>bla</i> _{IMP-1} R1	ACAACCAGTTTTGCCTTACC	
<i>bla</i> _{IMP-2} F2	GTTTTATGTGTATGCTTCC	۶۷۸bp
<i>bla</i> _{IMP-2} R2	AGCCTGTTCCCATGTAC	
<i>bla</i> _{VIM-1} F3	AGTGGTGAGTATCCGACAG	۲۶۱Bp
<i>bla</i> _{VIM-1} R3	ATGAAAGTGCGTGAGAC	
<i>bla</i> _{VIM-2} F4	ATGTTCAAACCTTTTGAGTAAG	۸۰۱Bp
<i>bla</i> _{VIM-2} R4	CTACTCAACGACTGAGCG	
<i>bla</i> _{SPM-1} F5	GCGTTTTGTTTGTTGCTC	۷۸۶bp
<i>bla</i> _{SPM-1} R5	TTGGGGATGTGAGACTAC	

۳-۶-۸-۲- حجم و غلظت مواد PCR جهت تکثیر آنزیم‌های متالوبتالاکتامازی SPM, IMP و

VIM

واکنش PCR برای هر یک از ژن‌های *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2} و *bla*_{SPM} در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام گرفت. غلظت و حجم نهایی مواد PCR در جدول ۲-۳ ذکر شده است.

جدول ۲-۳- حجم و غلظت نهایی مواد PCR برای ژن‌های *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM} و *bla*_{VIM}

ترکیبات واکنش	حجم (میکرولیتر)	غلظت
Master Mix	۲۱/۷۵	-
Primer Forward	۱	10 pmol
Primer Reverse	۱	10 pmol
Taq pol 5 u/μl	۰/۲۵	-
Template DNA	۱	-
حجم نهایی	۲۵	-

۳-۶-۸-۳- برنامه دمایی جهت تکثیر ژن‌های *bla_{IMP}*، *bla_{SPM}* و *bla_{VIM}*

برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های *bla_{IMP}*، *bla_{VIM}* و *bla_{SPM}* در جدول ۳-۳ نشان داده شده است.

جدول ۳-۳ برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های *bla_{IMP}*، *bla_{VIM}* و *bla_{SPM}*

ژن	initial denaturation	denaturation	annealing	extension	final extension
<i>bla_{IMP}</i>	96°C for 5min	96°C for 1min	53°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min
<i>bla_{VIM}</i>	96°C for 5min	96°C for 1min	53°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min
<i>bla_{SPM}</i>	96°C for 5min	96°C for 1min	53°C for 1min	72°C for 1min	72°C for 10min

۳-۶-۹- آشکارسازی و الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز

این مرحله از آزمایشات به منظور ارزیابی محصولات PCR انجام شد.

۳-۶-۹-۱- مواد و وسایل مورد نیاز برای الکتروفورز

▪ دستگاه الکتروفورز

▪ سمپلر و سر سمپلر

▪ پودر آگارز

▪ DNA Size marker یا DNA Ladder (۱۰۰ bp)

▪ Loading buffer و اتیدیوم بروماید

▪ ۵۰X TBE buffer

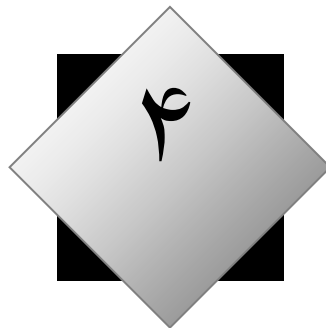
۳-۶-۹-۲- محلول رنگ آمیزی

جهت شناسایی DNA و محصول PCR در داخل ژل نیاز به رنگ آمیزی ژل داریم تا محل قرار گیری محصولات ما را مشخص کند، محلول های مختلفی برای رنگ آمیزی استفاده می شود، محلول مورد استفاده در این مطالعه اتیدیوم بروماید بود که جزء مواد اینترکاله شونده می باشد، این محلول از طریق قرارگیری در بین بازهای DNA محل محصول را در سطح ژل مشخص می کند، جهت شناسائی بایستی ژل را در معرض اشعه ماوراء بنفش قرار دهیم تا اتیدیوم بروماید فلورسانس نارنجی ایجاد نماید. از مخاطرات استفاده از این محلول سرطان زائی آن می باشد لذا در هنگام استفاده باید کلیه نکات ایمنی رعایت و از دستکش و ماسک مناسب و استاندارد استفاده نمود. جهت تهیه محلول استوک و ذخیره بایستی ۱۰ میلی گرم از پودر تجاری اتیدیوم بروماید را در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و در ظرف در بسته و به دور از نور مستقیم نگهداری نمائیم.

۳-۶-۹-۳- انجام الکتروفورز و روش تهیه ژل

در این مطالعه با توجه به وزن ژن های مورد نظر، ژل ۱٪ تهیه شد: برای تهیه ژل ۱٪ در قالب کوچک، ۱/۳ گرم پودر آگارز در ۱۳۰ میلی لیتر بافر ۱X TBE حل کرده و آن را می جوشانیم تا کاملاً آگارز در داخل بافر حل شود و محلول شفاف گردد. پس از رسیدن دمای محلول آگارز ساخته شده به حدود ۴۵ تا ۵۰ درجه به ازای هر ۱۰ میلی لیتر ژل، یک میکرولیتر محلول سایبر گرین اضافه شده و در نهایت ژل داخل قالب ریخته می شود. بعد از بستن کامل ژل ابتدا شانه را در آورده و ژل در داخل تانک الکتروفورز قرار می گیرد. داخل تانک به حدی بافر TBE می ریزیم که روی ژل را کاملاً بپوشاند. ۵ میکرولیتر از محصول PCR را با یک میکرولیتر بافر سنگین

کننده کاملاً مخلوط کرده و سپس به آرامی داخل چاهک‌ها قرار می‌گیرد. از آنجایی که DNA شارژ منفی دارد، به همین علت برای الکتروفورز شدن باید نمونه‌ها به طرف قطبی منفی باشد تا موقع الکتروفورز به سمت قطب مثبت حرکت کند. تانک الکتروفورز به منبع برق وصل شده و ولتاژ تنظیم شده ($70-80V$) و الکتروفورز شروع می‌شود. وقتی نمونه ۷۵٪ طول ژل را طی کرد ژل از تانک خارج شده و با دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده می‌شود. می‌توان عکس ژل را توسط دستگاه ژل داک تهیه کرد.



فصل چهارم:

نتایج

جداول
نمودارها
عکس ها

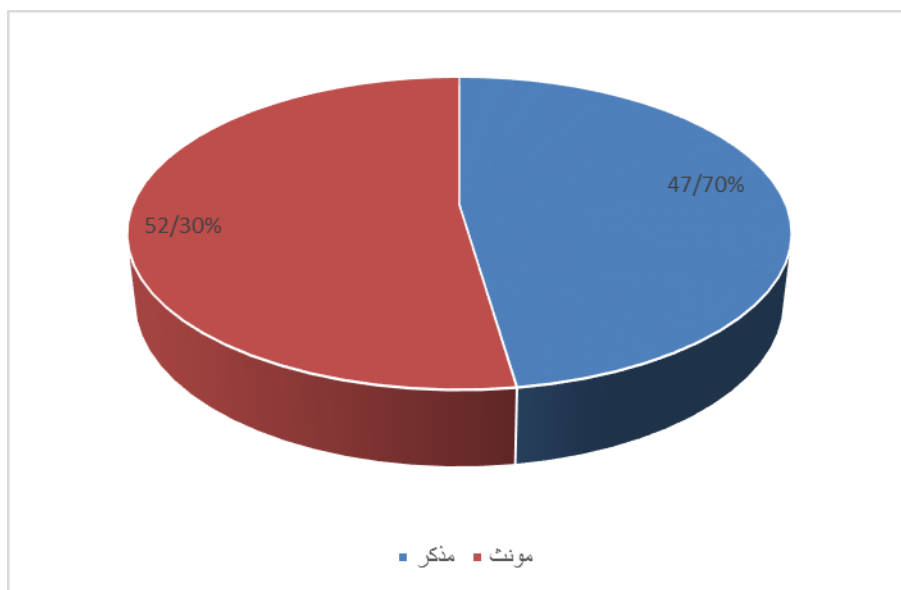
۴-۱- جمع آوری نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی مقطعی، ۳۵۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون، برونکوآلوتولار لاواژ، زخم، خلط و تراشه از بیمارستان امام حسین شهر تهران و بیمارستان های بوعلی، شهید رجائی، کوثر و ولایت شهر قزوین جمع آوری گردید.

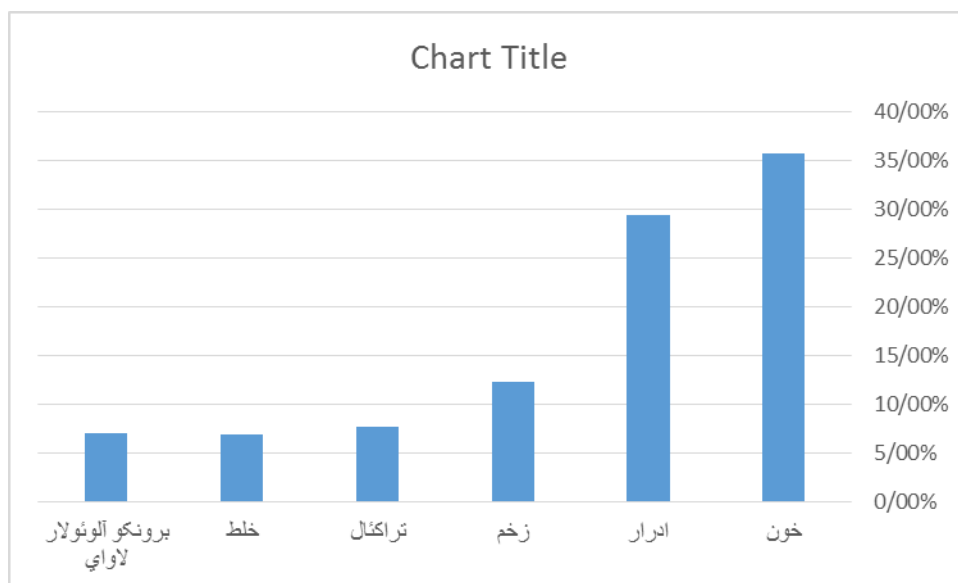
۴-۲- توزیع فراوانی ایزوله‌های جمع آوری شده بر اساس جنسیت و نوع نمونه بالینی

از ۳۵۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای جمع آوری شده از نمونه های بالینی، ۱۰۵ (۳۰ درصد) ایزوله مربوط به نمونه‌های ادرار، ۱۲۵ (۳۵,۷ درصد) ایزوله مربوط به خون، ۲۶ (۷,۴ درصد) ایزوله مربوط به برونکو آلوئولار لاواژ، ۴۳ (۱۲,۳ درصد) ایزوله مربوط به زخم، ۲۴ (۶,۹ درصد) ایزوله مربوط به خلط و ۲۷ (۷,۷ درصد) ایزوله مربوط به تراشه بود (نمودار ۴-۲). از نمونه‌های بالینی مورد بررسی، ۱۶۷ (۴۷,۷ درصد) نمونه مربوط به جنس مرد و ۱۸۳ (۵۲,۳ درصد) نمونه مربوط به زنان بودند که در نمودار ۴-۱ نشان داده شده است.

نمودار ۴-۱- توزیع فراوانی نسبی ایزوله‌های جمع آوری شده بر اساس جنسیت



نمودار ۴-۲- توزیع فراوانی نمونه‌های بالینی مختلف به کار رفته در این مطالعه



۴-۳- تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

جهت تأیید ایزوله‌ها از تست‌های میکروب شناسی و بیوشیمیایی مختلف استفاده شد. این تست‌ها شامل بررسی میکروسکوپی، رشد در محیط مک‌کانکی آگار، تست اکسیداز، واکنش در محیط TSI، تست OF، بررسی تحرک، رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد، رشد در محیط سیتريمید آگار و تولید پیگمان در محیط مولر هینتون آگار بود.

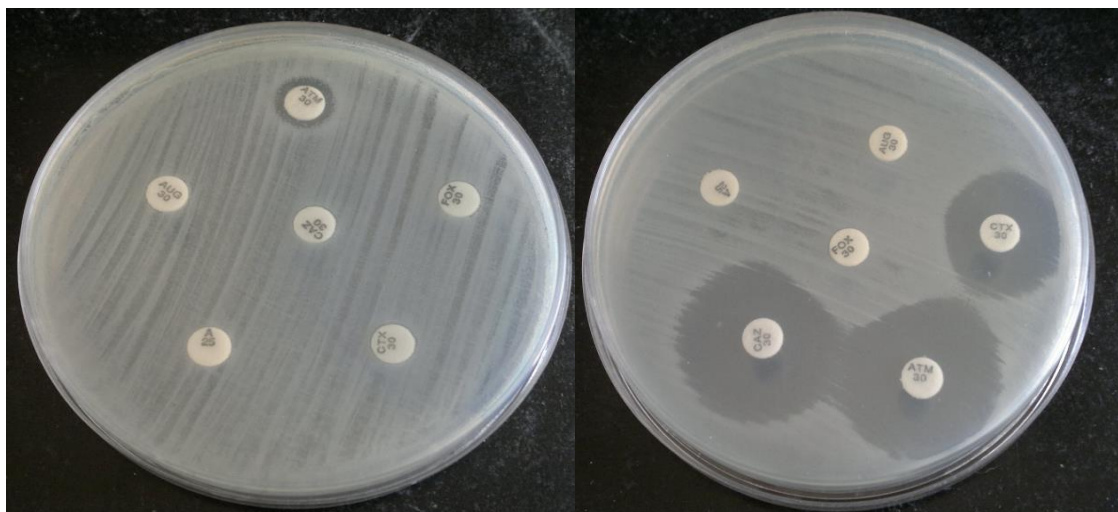
۴-۴- تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در جدول ۴-۱ بیان شده است. بیشترین درصد مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک سفپودوکسیم با ۹۸/۶ درصد و سفوتاکسیم با ۴۸/۹ درصد و کمترین درصد مقاومت مربوط به پلی میکسین با ۱/۷ درصد و آمیکاسین ۲۰/۶ درصد بود. ۱۳۸ ایزوله (۳۹/۴٪)، نسبت به ایملی‌پنم و مروپنم غیر حساس بودند که از نظر تولید متالوبتالاکتاماز مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، ۳۱/۷ درصد ایزوله‌ها نسبت به سه کلاس آنتی‌بیوتیکی یا تعداد بیشتری از آنتی‌بیوتیک‌های به کار رفته مقاوم بودند که به عنوان ایزوله‌هایی با مقاومت دارویی چند (Multi Drug Resistance) در نظر گرفته شدند.

جدول ۴-۱- الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

آنتی‌بیوتیک	مقاوم، تعداد(%)	حدواسط، تعداد(%)	حساس، تعداد(%)
سفیدوکسیم	۳۴۵ (% ۹۸/۶)	۰	۵ (% ۱/۴)
سفپیم	۱۱۱ (% ۳۱/۷)	۱۲ (% ۳/۴)	۲۲۷ (% ۶۴/۹)
آمیکاسین	۷۲ (% ۲۰/۶)	۲۴ (% ۶/۹)	۲۵۴ (% ۷۲/۶)
آزترونام	۱۲۶ (% ۳۶)	۷۶ (% ۲۱/۷)	۱۴۸ (% ۴۲/۳)
پلی میکسین	۶ (% ۱/۷)	۰	۳۴۴ (% ۹۸/۳)
ایمی‌پنم	۱۰۴ (% ۲۹/۷)	۲۲ (% ۶/۳)	۲۲۴ (% ۶۴)
مروپنم	۱۱۷ (% ۳۳/۴)	۱۷ (% ۴/۹)	۲۱۶ (% ۶۱/۴)
جنتامایسین	۱۴۶ (% ۴۱/۷)	۵ (% ۱/۴)	۱۹۹ (% ۵۶/۹)
پپراسیلین-تازوباکتام	۸۵ (% ۲۴/۳)	۳۱ (% ۸/۹)	۲۳۴ (% ۶۶/۹)
پپراسیلین	۱۰۶ (% ۳۰/۳)	۳۱ (% ۸/۹)	۲۱۳ (% ۶۰/۹)
سفتازیدیم	۱۲۴ (% ۳۵/۴)	۱۷ (% ۴/۹)	۲۰۹ (% ۵۹/۷)
سفوتاکسیم	۱۷۱ (% ۴۸/۹)	۱۵۱ (% ۴۳/۱)	۲۸ (% ۸)
سیپروفلوکساسین	۱۴۳ (% ۴۰/۹)	۱۲ (% ۳/۴)	۱۹۵ (% ۵۵/۷)
لووفلوکساسین	۱۶۰ (% ۴۵/۷)	۷ (% ۲)	۱۸۳ (% ۵۲/۳)
افلوکساسین	۱۵۷ (% ۴۴/۹)	۱۱ (% ۳/۱)	۱۸۲ (% ۵۲)
توبرامایسین	۱۴۰ (% ۴۰)	۵ (% ۱/۴)	۲۰۵ (% ۵۸/۶)
تیکارسیلین	۱۵۶ (% ۴۴/۶)	۷ (% ۲)	۱۸۷ (% ۵۳/۴)
کاربنی سیلین	۱۷۰ (% ۴۷/۶)	۱۵ (% ۴/۳)	۱۶۵ (% ۴۷/۱)

شکل ۴-۱- نمایش از نتیجه آزمون دیسک دیفیوژن در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا



۴-۴-۱- نتایج آزمون تاییدی (Combined Disk)

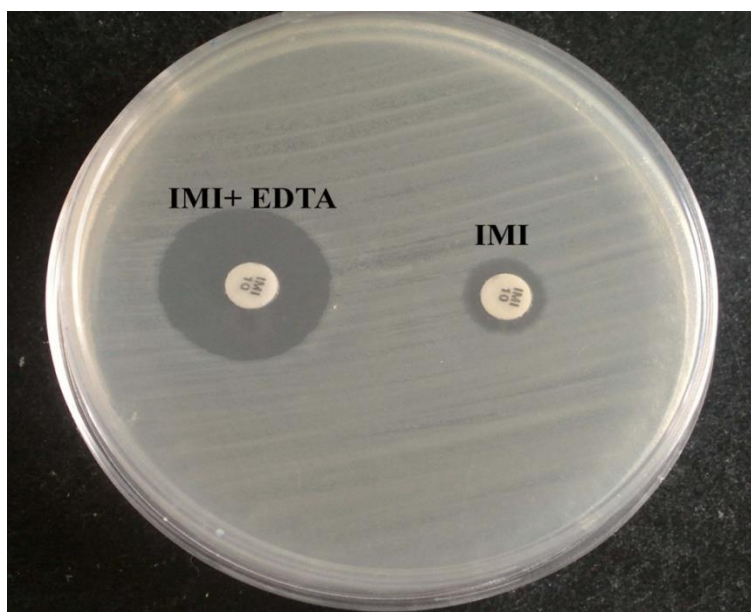
از ۳۵۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا، ۱۳۸ (۲۹/۴ درصد) ایزوله غیر حساس به ایمی‌پنم و مروپنم (هاله عدم رشد کمتر از ۱۷mm) بودند. از ۱۳۸ ایزوله، ۵۸ (۴۲/۰۲٪) ایزوله مولد MBL بودند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های مولد MBL و فاقد MBL (non-MBL) در جدول ۲-۴ مقایسه شده است. در بین ایزوله‌های مولد MBL، ۲۴ (۴۱/۴٪) ایزوله مربوط به نمونه‌های خون، ۱۳ (۲۲/۴٪) ایزوله مربوط به نمونه ادرار، ۶ (۱۰/۳٪) ایزوله مربوط به نمونه تراشه، ۶ (۱۰/۳٪) ایزوله مربوط به نمونه برونکو آلوئولار لاواژ و ۶ (۱۰/۳٪) ایزوله مربوط به زخم و ۳ (۵/۲٪) ایزوله مربوط به نمونه خلط بودند.

جدول ۴-۲- مقایسه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های مولد و غیر مولد MBL

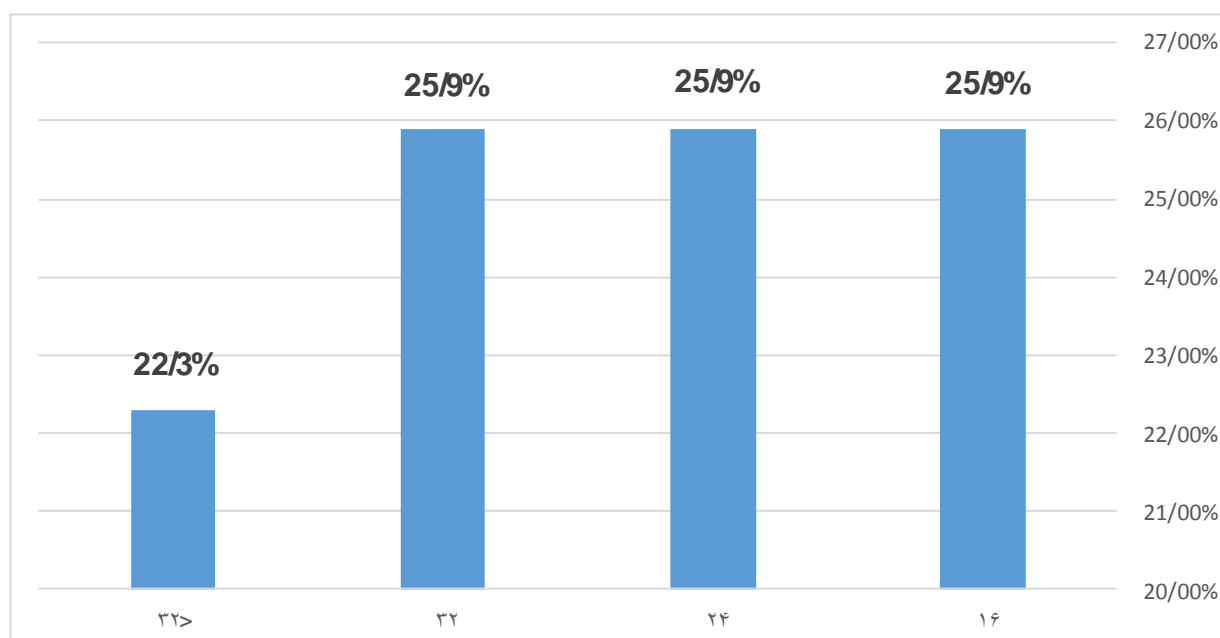
مقاوم، تعداد (%)		حدواسط، تعداد (%)		حساس، تعداد (%)		آنتی بیوتیک
non-MBL	MBL	non-MBL	MBL	non-MBL	MBL	
۶۳ (٪ ۲۱/۶)	۴۸ (٪ ۸۲/۸)	۱ (٪ ۱/۷)	۱۱ (٪ ۳/۸)	۹ (٪ ۱۵/۵)	۲۱۸ (٪ ۷۴/۷)	سفپیم
۲۸۷ (٪ ۹۸/۳)	۵۸ (٪ ۱۰۰)	۰	۰	۰	۵ (٪ ۱/۷)	سفپودوکسیم
۶۷ (٪ ۲۲/۹)	۳۹ (٪ ۶۷/۲)	۸ (٪ ۱۳/۸)	۲۳ (٪ ۷/۹)	۱۱ (٪ ۱۹)	۲۰۲ (٪ ۶۹/۳)	پیپراسیلین
۱۰۷ (٪ ۳۶/۶)	۵۳ (٪ ۹۱/۴)	۰	۷ (٪ ۲/۴)	۵ (٪ ۸/۶)	۱۷۸ (٪ ۶۱)	لووفلوکساین
۱۱۷ (٪ ۴۰/۱)	۵۳ (٪ ۹۱/۴)	۱ (٪ ۱/۷)	۱۴ (٪ ۴/۸)	۴ (٪ ۶/۹)	۱۶۱ (٪ ۵۵/۱)	کربنی سیلین
۳۹ (٪ ۱۳/۴)	۳۳ (٪ ۵۶/۹)	۸ (٪ ۱۳/۸)	۱۶ (٪ ۵/۵)	۱۷ (٪ ۲۹/۳)	۲۳۷ (٪ ۸۱/۲)	آمیکاسین
۸۰ (٪ ۲۷/۴)	۴۶ (٪ ۷۹/۳)	۷ (٪ ۱۲/۱)	۶۹ (٪ ۲۳/۶)	۵ (٪ ۸/۶)	۱۴۳ (٪ ۴۹)	آزترونام
۶۶ (٪ ۲۲/۶)	۵۱ (٪ ۸۷/۹)	۵ (٪ ۸/۶)	۱۲ (٪ ۴/۱)	۲ (٪ ۳/۴)	۲۱۴ (٪ ۷۳/۳)	مروپنم
۹۵ (٪ ۳۲/۵)	۴۵ (٪ ۷۷/۶)	۱ (٪ ۱/۷)	۴ (٪ ۱/۴)	۱۲ (٪ ۲۰/۷)	۱۹۳ (٪ ۶۶/۱)	توبرامایسین
۱۰۶ (٪ ۳۶/۳)	۵۱ (٪ ۸۷/۹)	۱ (٪ ۱/۷)	۱۰ (٪ ۳/۴)	۶ (٪ ۱۰/۳)	۱۷۶ (٪ ۶۰/۳)	اوفلوکساسین
۵۰ (٪ ۱۷/۱)	۳۵ (٪ ۶۰/۳)	۹ (٪ ۱۵/۵)	۲۲ (٪ ۷/۵)	۱۴ (٪ ۲۴/۱)	۲۲۰ (٪ ۷۵/۳)	پیپراسیلین - تازوباکتام
۵ (٪ ۱/۷)	۱ (٪ ۱/۷)	۰	۰	۵۷ (٪ ۹۸/۳)	۲۸۷ (٪ ۹۸/۳)	پلی میکسین
۵۶ (٪ ۱۹/۲)	۴۸ (٪ ۸۲/۸)	۶ (٪ ۱۰/۳)	۱۶ (٪ ۵/۵)	۴ (٪ ۶/۹)	۲۲۰ (٪ ۷۵/۳)	ایمی پنم
۹۵ (٪ ۳۲/۵)	۵۱ (٪ ۸۷/۹)	۰	۵ (٪ ۱/۷)	۷ (٪ ۱۲/۱)	۱۹۲ (٪ ۶۵/۸)	جنتامایسین
۷۹ (٪ ۲۷/۱)	۴۵ (٪ ۷۷/۶)	۱ (٪ ۱/۷)	۱۶ (٪ ۵/۵)	۱۲ (٪ ۲۰/۷)	۱۹۷ (٪ ۶۷/۵)	سفتازیدیم
۱۲۱ (٪ ۴۱/۴)	۵۰ (٪ ۸۶/۲)	۸ (٪ ۱۳/۸)	۱۴۳ (٪ ۴۹)	۰	۲۸ (٪ ۹/۶)	سفوتاکسیم
۹۲ (٪ ۳۱/۵)	۵۱ (٪ ۸۷/۹)	۲ (٪ ۳/۴)	۱۰ (٪ ۳/۴)	۵ (٪ ۸/۶)	۱۹۰ (٪ ۶۵/۱)	سیپروفلوکساسین
۱۰۵ (٪ ۳۶)	۵۱ (٪ ۸۷/۹)	۱ (٪ ۱/۷)	۶ (٪ ۲/۱)	۶ (٪ ۱۰/۳)	۱۸۱ (٪ ۶۲)	تیکارسیلین

در شکل ۲-۴ نمایی از آزمون دیسک ترکیبی نشان داده شده است.

شکل ۲-۴- تست تاییدی فنوتیپی جهت شناسایی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد MBL



نمودار ۳-۴- نتایج حداقل غلظت مهاري (MIC) با روش E- test در ایزوله های دارای ژن متالوبتا لاکتاماز



۴-۵- PCR برای تشخیص آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز IMP، VIM و SPM

در ادامه شناسایی ژن‌های *bla*_{IMP-1}، *bla*_{IMP-2}، *bla*_{VIM-1}، *bla*_{VIM-2} و *bla*_{SPM} در سویه‌های مولد MBL با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با روش PCR انجام شد. از ۵۸ (۴۲/۰۲٪) ایزوله سودوموناس آئروژینوزای مولد MBL، ۱۷ ایزوله (۲۹/۳٪) حامل ژن *bla*_{IMP-1}، ۱۳ ایزوله (۱۹/۷٪) حامل ژن *bla*_{VIM-1} به تنهایی و یا به صورت ترکیبی بودند. در این مطالعه همچنین ۳ (۵/۲٪) ایزوله به طور همزمان حامل هر دو ژن *bla*_{IMP-1} و *bla*_{VIM-1} بودند.

توزیع فراوانی نمونه‌های بالینی مختلف حامل ژن‌های متالو بتالاکتامازی در جدول ۴-۳ آمده است. ژن‌های *bla*_{IMP-2}، *bla*_{VIM-2} و *bla*_{SPM} در ایزوله‌های مورد مطالعه ما جدا سازی نشدند. مشخصات کامل ایزوله‌های مولد متالوبتالاکتامازهای IMP-1 و VIM-1 در جدول ۴-۴ آمده است.

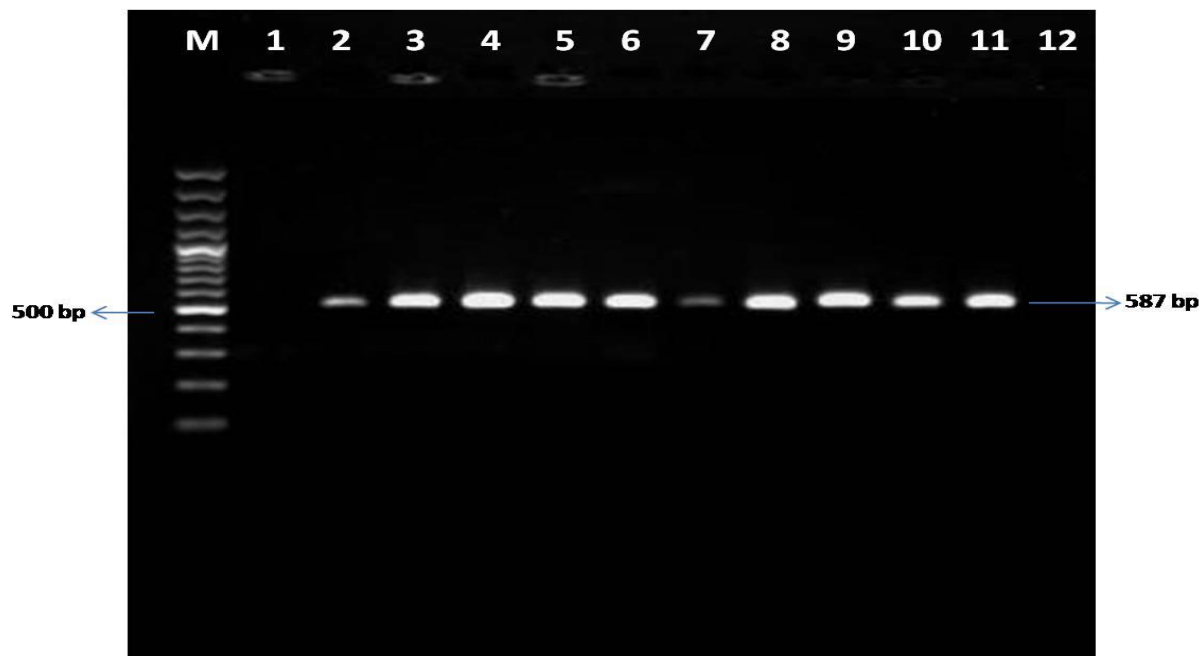
همچنین در شکل ۴-۳، ۴-۴ و ۴-۵ نمای الکتروفورز ژل آگارز (۱٪) مربوط به شناسایی ژن‌های متالوبتالاکتاماز

IMP، SPM، VIM نشان داده شده است.

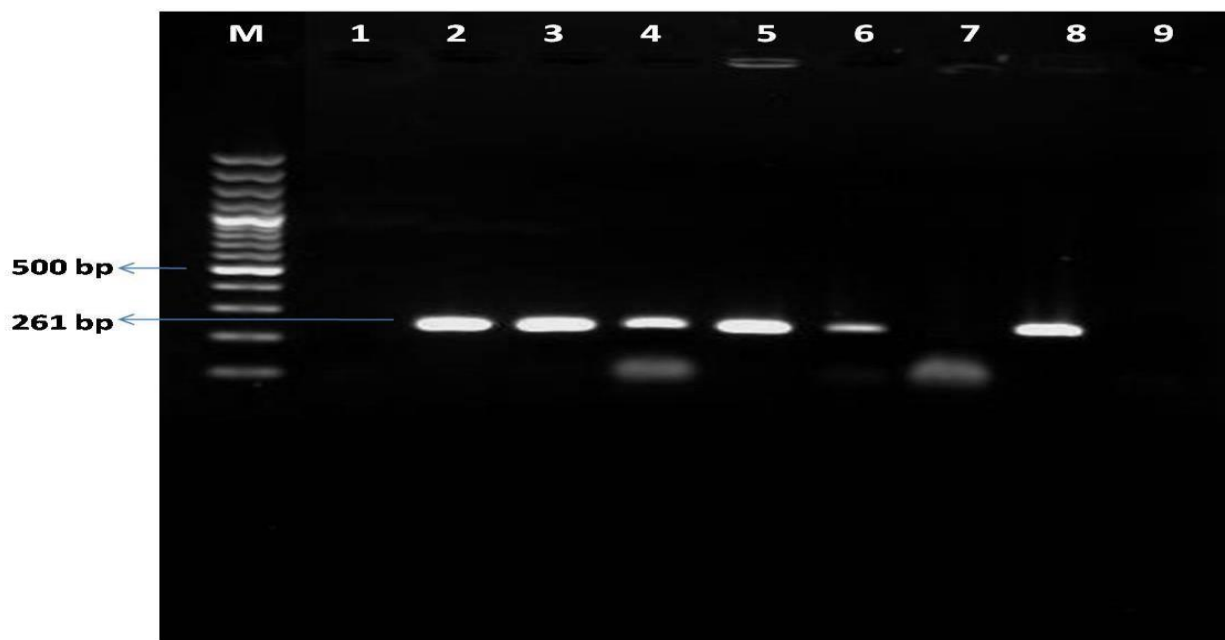
جدول ۳-۴ توزیع فراوانی نمونه‌های بالینی مختلف حامل ژن‌های متالوبتالاکتامازی

ژن متالوبتالاکتاماز	ادرار	خون	برونکو آلوئولار لاواژ	تراکئال	خلط	زخم
IMP	۶(٪۳۵/۸)	۷(٪۴۱/۲)	۲(٪۱۱/۸)	۰	۰	۲(٪۱۱/۸)
VIM	۷(٪۵۳/۸)	۴(٪۳۰/۸)	۰	۰	۰	۲(٪۱۵/۴)
SPM	۰	۰	۰	۰	۰	۰
IMP و VIM	۲(٪۶۶/۷)	۱(٪۳۳/۳)	۰	۰	۰	۰

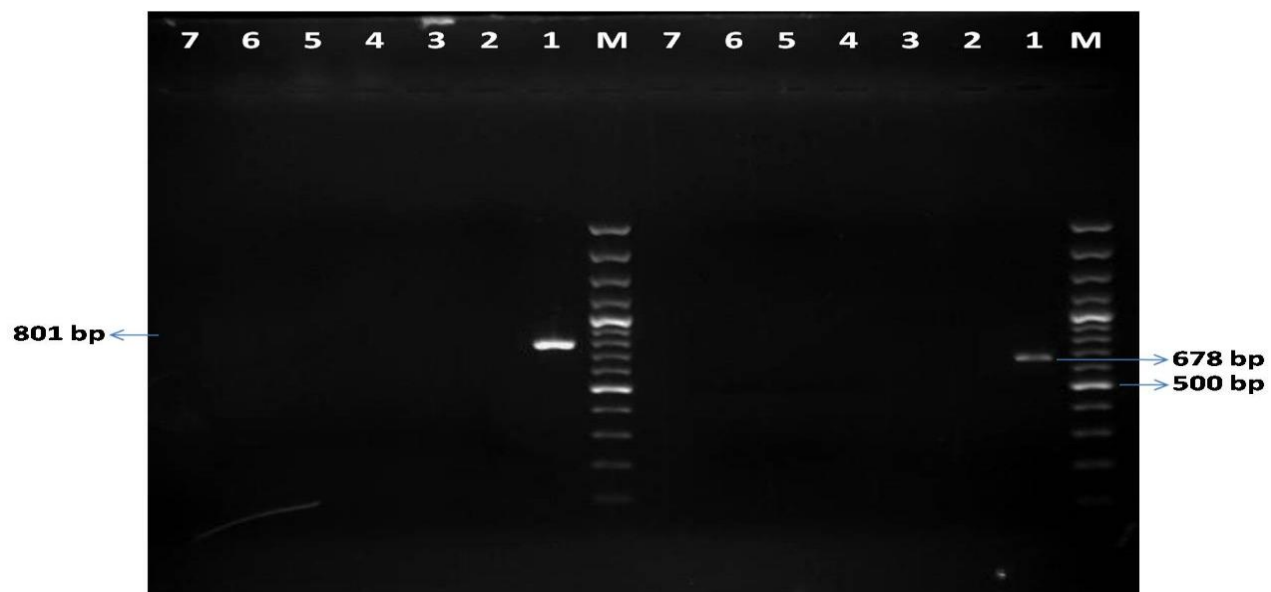
شکل ۳-۴ الکتروفورز محصولات PCR حامل ژن *bla*_{IMP-1} بر روی ژل آگارز ۱ درصد.



شکل ۴-۴- الکتروفورز محصول PCR ژن *bla_{VIM-1}* بر روی ژل آگارز ۱ درصد.



شکل ۴-۵- الکتروفورز PCR ژن *bla_{VIM-2}* و *bla_{IMP-2}* بر روی ژل آگارز ۱ درصد.



جدول ۴-۴ مشخصات کامل ایزوله های مولد متالوبتالاکتاماز های IMP-1 و VIM-1

ایزوله ها	سن	جنس	ward	source	نوع متالو بتالاکتاماز	MIC	آنتی بیوتیک
P.S 16	۷۱	زن	ICU	خون	VIM-1	≥ 16	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= S, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R
P.S 26	۳۲	مرد	داخلی	خون	VIM-1	≥ 24	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= S, CTX= I, CAZ= S, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= S, ATM= I, LEV= R, PRL= R, CPD= R
P.S 176	۶۲	زن	عفونی	ادرار	VIM-1	≥ 32	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= I, OFX= R, TN= R, ATM= I, LEV= R, PRL= I, CPD= R
P.S 177	۴۷	مرد	عفونی	زخم	VIM-1	>32	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= R, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R
P.S 179	۴۹	زن	عفونی	ادرار	VIM-1	≥ 16	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R
P.S 192	۲۹	زن	ICU	برونکوالونولار لاواژ	IMP-1	>32	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R
P.S 213	۳۰	مرد	عفونی	ادرار	VIM-1	>32	IMP= R, MEM= I, CPM= S, AK= S, CTX= R, CAZ= S, TC= R, CIP= S, GM= R, PB= S, PTZ= S, OFX= R, TN= R, ATM= S, LEV= R, PRL= S, CPD= R
P.S 217	۲۴	زن	عفونی	خون	IMP-1+ VIM-1	≥ 32	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= S, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R
P.S 223	۵۰	زن	جراحی	زخم	IMP-1	>24	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R
P.S 224	۴۷	مرد	عفونی	ادرار	IMP-1	>16	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= S, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= I, OFX= R, TN= R, ATM= I, LEV= R, PRL= R, CPD= R
P.S 231	۳۳	زن	عفونی	خون	IMP-1	>16	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R
P.S 234	۵۷	زن	داخلی	ادرار	IMP-1+ VIM-1	≥ 24	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R
P.S	۴۶	زن	ICU	برونکوالونولار	IMP-	≥ 16	IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= I, CTX= R, CAZ= R, TC= S, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= S, OFX= S, TN= R, ATM= R,

LEV=S, PRL=S,CPD= R			1	لاواژ				241
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R	≥32		IMP-1	خون	عفونی	زن	۲۴	P.S 244
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R	>16		IMP-1	خون	داخلی	زن	۳۶	P.S 245
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R	≥32		IMP-1	ادرار	ICU	زن	۴۲	P.S 247
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= I, OFX= R, TN= S, ATM= I, LEV= R, PRL= R, CPD= R	>32		IMP-1	خون	داخلی	زن	۳۳	P.S 252
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= S, CPD= R	≥32		IMP-1+ VIM-1	ادرار	عفونی	مرد	۶۱	P.S 254
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= I, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= S, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R	>24		VIM-1	خون	جراحی	مرد	۳۹	P.S 264
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= I, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= I, CPD= R	≥ 24		IMP-1	خون	ICU	زن	۵۹	P.S 277
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= S, OFX= S, TN= S, ATM= S, LEV= S, PRL= S, CPD= R	≥ 24		IMP-1	ادرار	عفونی	مرد	۶۱	P.S 278
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= R, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R	≥ 32		IMP-1	خون	ICU	زن	۷۴	P.S 279
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= I, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= I, CPD= R	≥16		IMP-1	ادرار	داخلی	زن	۳۷	P.S 292
IMP= R, MEM= R, CPM= R, AK= R, CTX= R, CAZ= R, TC= R, CIP= R, GM= R, PB= S, PTZ= I, OFX= R, TN= R, ATM= R, LEV= R, PRL= R, CPD= R	≥ 24		IMP-1	زخم	جراحی	مرد	۷۷	P.S 295

دامنه MIC: ۰/۰۲ - ۳۲



فصل پنجم:

بحث و نتیجه‌گیری

- بحث
- نتیجه‌گیری
- پیشنهادات

۵-۱- بحث

در حال حاضر استفاده بیش از حد و خود سرانه از آنتی بیوتیک ها یکی از دلایل مهم شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در مناطق مختلف می باشد. افزایش بی‌رویه داروهای بتالاکتام وسیع الطیف و بستری طولانی مدت بیماران سبب انتشار باکتری‌های تولید کننده MBL می شوند. باکتری‌های مولد متالو بتالاکتاماز (معمولا دارای الگوی مقاومت دارویی چندگانه) عامل عفونت های جدی می باشند که درمان آنها مشکل‌زا است و منجر به افزایش مرگ و میر می گردد. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز تمامی آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام را دارند که بیشتر در باکتری‌های سودوموناس و اسینتوباکتر یافت می شوند. به خاطر توانایی باکتری‌های گرم منفی در انتقال ژنتیکی مانند پلاسمیدها، بیم آن می‌رود که این آنزیم‌ها به سایر باکتری‌های گرم منفی شایع مانند /شریشیا کلی و کلبسیلا انتقال یابند، کما این که گزارش های متعددی از باکتری‌های شایع تولید کننده آنزیم- های متالو بتالاکتاماز در سراسر دنیا شده است (۹۴).

به طور خلاصه مشکلاتی که متالو بتالاکتامازها به وجود می‌آورند عبارتند از:

- A: ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها روی پلاسمید واقع شده‌اند که براحتی قابل انتقال به سایر باکتری‌ها هستند.
- B: افزایش انتقال این ژن‌ها از سودوموناس /آئروژینوزا/ به اعضای خانواده انتروباکتریاسه‌ها باعث گسترش این گونه از مقاومت‌ها در برابر سایر باکتری‌ها شده است.

C: متالو بتالاکتامازها نه تنها سبب مقاومت به کارباپنم‌ها می‌شود، بلکه باعث ایجاد مقاومت به آمینوگلیکوزیدها

نیز می‌شود.

D: نبود مهار کننده دارویی مؤثر سبب محدودیت مصرف کاربایتم‌ها می‌شود (۸۲،۹۴).

سودوموناس آئروژینوز/ پاتوژنی فرصت طلب و یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی است. با توجه به مقاومت روز افزون این باکتری به داروهای ضد میکروبی بخصوص ترکیبات بتالاکتام، سبب ایجاد عفونت‌های شدید مانند پنومونی، سپتی سمی و عفونت‌های پوستی (در افراد دچار سوختگی) می‌شود (۹۵).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، بیشترین درصد مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک های سفپودوکسیم با ۹۸/۶ درصد و سفوتاکسیم با ۴۸/۹ درصد و بیشترین درصد حساسیت مربوط به آنتی بیوتیک های پلی میکسین با ۹۸/۳ درصد و آمیکاسین ۷۲/۶ درصد بود. در مطالعه‌ای که صادری و همکاران سال ۲۰۱۰ انجام دادند درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمیکاسین، جنتامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۷۳٪، ۸۶٪، ۷۳٪، ۵۵٪ بود. در مطالعه ما میزان مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها بطور چشمگیری پائین بود شاید یکی از دلایل این تفاوت، نحوه درمان و آنتی‌بیوتیک تجویز شده باشد (۹۰). در مطالعه دیگری که توسط فولادی سال ۸۹ انجام گرفت درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، تتراسیکلین، سفوتاکسیم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم به ترتیب برابر با ۱۷/۳٪، ۸۶/۴٪، ۴۳/۶٪، ۲۵/۵٪، ۲۰/۹٪، ۲۰/۹٪ بود که با

مطالعه همخوانی داشت (۸۹). سودوموناس آئروژینوز ا به سبب ماهیت ژنتیکی، پذیرنده انواع ژن‌ها از قبیل پلاسمید و ترانسپوزون‌ها می باشد و به همین سبب می تواند سریعاً نسبت به انواع آنتی بیوتیک ها مقاوم شود. بنابراین با توجه به قابلیت بالای این ارگانیسم در کسب مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف، نظارت مستمر بر تغییرات حساسیت این باکتری ضروری است. استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها به خصوص

فلوروکینولون‌ها و کارباپنم‌ها از عوامل خطر برای مقاوم شدن این باکتری نسبت به این داروها محسوب می‌شود.

در مطالعه‌ی اخیر میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ای‌می‌پنم، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم به ترتیب برابر با ۲۹/۷ درصد، ۴۰/۹ درصد و ۳۵/۴ درصد بود. طی مطالعه‌ای که توسط ژاپنی و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام گرفت، میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به ترتیب برابر با ۶۷/۱ درصد، ۲۷/۱ درصد، ۱۵/۷ درصد گزارش گردید (۹۸). صادری و همکاران در سال ۲۰۰۷، میزان مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور به ترتیب ۳۸/۲ درصد، ۴۹/۲ درصد، ۷۴/۲ درصد عنوان کردند (۹۹). همچنین در بررسی صورت گرفته توسط میرصالحیان و همکاران در سال ۲۰۰۸، درصد مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها برابر با ۶۳ درصد، ۸۳ درصد، ۸۵ درصد گزارش گردید (۱۰۰). در مطالعه‌ی ایراجیان و همکاران سال ۲۰۰۹، نیز این میزان به ترتیب برابر با ۹۴/۹ درصد، ۹۸/۷ درصد، ۱۰۰ درصد عنوان شد (۱۰۱). روند این مطالعات در کل افزایش میزان مقاومت به آنتی - بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد. ولی این افزایش دارای نوساناتی، از جمله در مورد ای‌می‌پنم است. با توجه به این که در همه مطالعات از روش انتشار دیسک استفاده شده است. علت این نوسانات می‌تواند؛ تفاوت مقاومت در مناطق مختلف، نوع عفونت، و یا نوع دیسک‌های مورد استفاده باشد. اما در کل این موضوع تأمل برانگیز است و بیشتر باید مورد بررسی و تعمق قرار گیرد.

در مطالعه اخیر از میان ۱۳۸ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای غیر حساس به کارباپنم‌ها، ۵۸ (۴۲/۰۲٪) ایزوله سودوموناس آئروژینوزای مولد متالوبتالاکتاماز بودند.

در مطالعه‌ی Arunagiri از ۱۶۷ ایزوله سودوموناس *آئروژینوزا*، ۷۰/۱ درصد ایزوله‌ها مولد MBL بودند، که از این میان ۲ (۳ درصد) ایزوله حامل ژن *bla_{IMP}* بودند که این میزان در مقایسه با مطالعه ما بسیار پائین بود (۷۹). در بررسی که سال ۲۰۰۷ توسط شکیبایی بر روی ۱۲۰ ایزوله سودوموناس *آئروژینوزا* انجام گرفت، هیچ ایزوله مولد MBL گزارش نگردید (۹۴). در مطالعه اخیر جهت غربالگری سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز از روش IMP-EDTA استفاده شد. مشخص شد که ۴۲/۰۲ درصد سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم، مولد MBL بودند. در مطالعه خسروی و همکاران با روش E-test در سال ۲۰۰۷ این میزان ۱۹/۵ درصد (۹۱)، در مطالعه شاهچراغی و همکاران با روش E-test این میزان ۷۲ درصد است (۹۲). در فرانسه سال ۲۰۰۴ با روش IPM-EDTA میزان ۴۶ درصد (۶۶) و در کشور کره ۳۱ درصد گزارش گردیده است (۶۶). نتایج مطالعه اخیر با نتایج مطالعات ذکر شده متفاوت بود، علت این تفاوت می‌تواند استفاده از روش‌های مختلف و تفاوت در میزان مقاومت در سایر مناطق باشد. در مطالعه‌ی Park و همکاران در کره از ۹۹ ایزوله سودوموناس *آئروژینوزا* مقاوم به ایمی‌پنم، ۳۱ ایزوله مولد MBL بودند که از این میان، ۲ (۲/۰۲ درصد) ایزوله حامل ژن *bla_{IMP}* بودند (۷۸).

در مطالعه‌ای که در پاریس جهت تعیین فنوتیپ MBL به روش دیسک ترکیبی همانند روش بررسی در این تحقیق انجام گرفت ۴۶ درصد این ایزوله‌ها واجد این فنوتیپ بودند. بعد از انجام تست PCR برای شناسایی ژن‌های مولد MBL بر روی این ایزوله‌ها حدود ۱۰۰ درصد همخوانی با نتایج حاصل از روش فنوتیپی داشت. این مطالعه نشان دهنده دقت در روش شناسایی فنوتیپی MBLs با روش دیسک ترکیبی می‌باشد (۸۱). نتیجه این بررسی نشان داد که روش دیسک ترکیبی که برای فنوتیپی MBL بکار می‌رود از روش‌های تاییدی CLSI بوده

و با روش E-test و PCR مطابقت دارد. در مطالعه اخیر انجام گرفته میزان شیوع ژن‌های متالوبتالاکتامازی بیشتر از مطالعه‌های قبلی انجام گرفته در ایران است، که نشان دهنده افزایش شیوع سویه‌های مولد متالوبتالاکتامازها است.

در بررسی که در سال ۲۰۰۸ در هند انجام شد ۲۰/۸ درصد از ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مولد MBL بودند، که با مطالعه‌ی ما مطابقت داشت (۹۶). در مطالعه‌ای که در کشور ژاپن انجام گرفت، نشان داده شد که بیماران عفونی شده با *سودوموناس آئروژینوزا*‌های مولد MBL جهت درمان آنتی بیوتیک‌های مختلفی دریافت می‌کنند و مرگ و میر ناشی از عفونت توسط این نوع باکتری‌ها بیشتر از انواع *سودوموناس آئروژینوزا*‌هایی است که متالوبتالاکتاماز منفی هستند (۹۷). لذا با توجه به اهمیت بالینی این سویه‌های مقاوم در بیمارستان‌ها، شناسایی سریع ارگانسیم‌های مولد این آنزیم‌ها و به کارگیری ابزارهای مناسب کنترل عفونت جهت جلوگیری از انتشار بیشتر این ارگانسیم‌ها ضروری است.

در این مطالعه مشخص شد که از میان ۵۸ ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا*ی مولد متالوبتالاکتاماز، ۱۷ ایزوله (۲۹/۳ درصد) حامل ژن *blaIMP-1*، ۱۳ ایزوله (۱۹/۷ درصد) حامل ژن *blaVIM-1* به تنهایی و یا به صورت ترکیبی بودند. همچنین در مطالعه حاضر ۳ (۵/۲ درصد) ایزوله به طور همزمان حامل هر دو ژن *blaIMP-1* و *blaVIM-1* بودند. ژن‌های *blaIMP-2*، *blaVIM-2* و *blaSPM* در ایزوله‌های مورد مطالعه ما جدا سازی نشدند.

در این مطالعه اکثر سویه‌های مولد متالوبتالاکتاماز از خون (۴۱/۲ درصد) و ادرار (۳۵/۸ درصد) جدا شدند، با توجه به این که آنزیم‌های MBL غالباً ماهیت اینتگرونی داشته و توانایی انتقال به پلاسمید یا کروموزوم را

دارند، لذا نشان از توانایی ایزوله های بالینی مولد MBL در انتقال و سرایت به سایر پاتوژن ها دارد. در مطالعه-ایی که Gomes و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای شناسایی متالوبتالاکتامازها در سودوموناس های مقاوم به ایمی-پنم انجام دادند، نشان داده شد که ۳۴/۵ درصد از نمونه های خون مورد بررسی مقاوم به ایمی پنم بودند. در مطالعه ای ما نیز فراوانی مقاومت به ایمی پنم تقریباً مشابه با این مطالعه (۲۹/۴ درصد) در بین ایزوله ها مشاهده گردید (۸۷). طی مطالعه ای که توسط Ellington و همکاران بر روی ۶۰ ایزوله ای سودوموناس، کلبسیلا و اسینتوباکتر انجام گرفت، ۱۱ ایزوله مولد ژن *blaIMP* بودند که از این تعداد ۸ ایزوله، ۲ ایزوله و ۱ ایزوله به ترتیب در سودوموناس، کلبسیلا و اسینتوباکتر مشاهده شد، شیوع این ژن در مطالعه اخیر با فراوانی حدود متوسط (۱۷-۱۶/۳۴ درصد) گزارش شد. همچنین در مطالعه آنها مشابه مطالعه ما ایزوله ای که واجد ژن *blaSPM* باشد شناسایی نشد (۸۳). در سال ۲۰۰۸ در تایوان مطالعه کامل و مفصلی در مورد آنزیم های متالوبتالاکتامازها انجام شد که در این مطالعه ژن های *blaIMP*, *blaVIM*, *blaSPM*, *blaSIM*, *blaGIM* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که ژن های *blaVIM* 2,3,11 در میان ایزوله ها دارای بیشترین میزان می باشند، ژن های *blaSIM*, *blaSPM*, *blaGIM* وجود نداشتند (۸۴).

در مطالعه Sader و همکاران میزان شیوع ژن *blaSPM* ۵۵/۶ درصد گزارش شد که برخلاف مطالعه ما میزان شیوع بالایی را نشان می دهد و میزان شیوع *blaIMP* ۸/۳ درصد مشاهده گردید که فراوانی آن کمتر از میزان مطالعه ای ما می باشد (۸۰). در بررسی که میهنی و همکاران انجام دادند ایزوله ای که حامل ژن *blaIMP* باشد، شناسایی نشد، لیکن در مطالعه ای ما شیوع این ژن برابر با ۲۹/۳ درصد بود (۷۵). مطالعات اخیر نشان دهنده

افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها توسط متالوبتالاکتامازها در ایران می باشد و از آنجائی که سودوموناس
آئروژینوز/ به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب در محیط های بیمارستانی مطرح می باشد. باید این نوع ایزوله ها در
آزمایشگاه های بالینی تشخیص داده شوند تا درمان مناسب جهت عفونت های حاصل از آنها صورت گیرد تا از
شیوع هر چه بیشتر آنها جلوگیری شود.

۵-۲- نتیجه‌گیری

شناسایی سریع و ردیابی ایزوله‌های مولد آنزیم‌های متالو بتالاکتاماز می‌تواند گامی مهم و اساسی در درمان عفونت‌های ناشی از این ایزوله‌ها به شمار رود.

پیشنهادهات

- ارزیابی سایر آنزیم‌های MBL مانند آنزیم‌های NDM, AIM, GIM

- ارزیابی آنزیم‌های ESBL مانند آنزیم‌های TEM, SHV, CTX-M

- ارزیابی میزان شیوع مولدین MBL در بازه زمانی طولانی تر

References

- 1- Giamarellou H. Prescribing guidelines for serve *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49:229- 233.
- 2- Lam J. and Chan R. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* whitin infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immune.* 2000; 28: 546-556.
- 3- Giamarellos-Bourboulis EJ, Papadimitriou E, Galanakis N, et al. Multidrug resistance to antimicrobials as a predominant factor influencing patient survival. *J Antimicrob Agents.* 2006; 27:476-481.
- 4- Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11:17–32.
- 5- Gilardi GL. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* species isolated from clinical specimens. *Appl Microbiol.* 2001; 21 (3): 414-419.
- 6- De Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol.* 2009; 11(2): 279–288.
- 7- Nicas T I and Bradley J. The role of exoenzyme S in infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis.* 2003; 152 (4): 716-720.
- 8- Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *New England J Med.* 1999; 302 (24): 1360-1362.
- 9- Japoni A, Farshad S, Alborzi A. *Pseudomonas aeruginosa*: Burn Infection, Treatment and Antibacterial Resistance. *Iranian Med J.* 2009; 11(3):244-253.
- 10- Muller M. Pyocyanin iduces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic Biol Med.* 2002; 1 (11): 1527-1533.

- 11- Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*. 2004; 10(12): 599-606.
- 12- Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 2007; 67:351-368.
- 13- Satti L, Abbasi Sh, Ahmed Qumar T, Khan MSH, Hashmi AZ. In Vitro Efficacy of Cefepime against Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* – An Alarming Situation in our Setup. *Drug Resistance J*. 2011; 1: 12-16.
- 14- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*. 2006; 36: 78–91.
- 15- Gerald BP, Reuben R. Mandell, Infectious diseases. 2010; 2835-2857. 7th Ed.
- 16- Ramsey DM, Wozniak DJ. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol*. 2005; 56:309-22.
- 17- Guedes SE, Dias W, da Silva D. Study of biological characteristics of *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. *Bras J Infect Dis*. 2008; 12:86-8.
- 18- Wendelboe A, Baumbach J. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections caused by a contaminated cystoscope. *New Mexico Epidemiol Rep*. 2007; 6:1-4.
- 19- Michalkiewicz J, Stachowski J, Barth C, Patzer J, Dzierzanowska D, Madalinski K. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on IFN-synthesis: expression of costimulatory molecules on monocytes and activity of NK cells. *Immunol*. 1999; 69(3):359-366.

- 20-Fogle MR, Griswold JA, Oliver JW, Hamood AN. Anti-ETA IgG neutralizes the effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *J Surg Res.* 2002; 106(1):86-98.
- 21-Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K . Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview, *J of Infect and Public Healt*, 2009; 2:101-111.
- 22-Matar G, Ramlawi F, Hijazi NKheisser I, Abdelnoor A. Transcriptionlevels of *pseudomonas aeruginosa* exotoxinA gene and severity of symptoms inpatients with otitis externa. *Current Microbiol.* 2002; 45:350-354.
- 23-Schumann J, Bluethmann H, Tiegs G. Synergism of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A with endotoxin, superantigen, or TNF results in TNFR.- and TNFR.- dependent liver toxicity in mice. *Immuno Lett.* 2000; 74(2):165-172.
- 24-Johnson JM, Churck GM. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of Bacterial efflux pumps. *J Mol Biol.* 1999; 287(3): 695-715.
- 25-Murray RGE, Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore. 2001; p: 141-219.
- 26-Winstanley C, Coulson MA, Wepner B, Morgan JA, Hart CA. Flagellin gene and protein variation amongst clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 1996; 142 (8): 2145-2151.
- 27-Murate T, Gotoh N, Nishino T. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 217(1): 57063.

- 28- Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005; 68: 718–725.
- 29- Guedes SE, Dias W, da SD. Study of biological characteristics of *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. *Bras J Infect Dis*. 2008; 12(1):86-88.
- 30- Barbieri JT, Sun J. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2004; 152:79–92.
- 31- Nikbin VS, Aslani MM, Sharafi Z, et al. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. *IJM*. 2012; 6(3):118-123.
- 32- Sacha P, Wieczorek P, Hauschild T, et al. Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa*: a novel mechanism resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008; 46:137-42.
- 33- Hamud-Socoro AA. *Pseudomonas aeruginosa* resistance to tetracycline and triclosan. *Cantaurus*. 2004; 12: 7-9.
- 34- Manafi A, Kohanteb J, Mehrabani D, et al. Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model. *BMC Microbiol*. 2009; 9(23):1-5.
- 35- Fink-Barbancon V, Goranson J, Zhu L, Sawa T, et al. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol*. 1997; 25(3):547-557.

- 36- Maschmeyer G, Braveny I. Review of the Incidence and prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients in the 1990s. *Eur J clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19: 915- 925.
- 37- Borriell P, Patrick RM, Guido F. Topley and wison's microbiology and microbial infections. 2006; p: 1591-1607.
- 38- Rastegar Iari A, Bahrami H, Alaghebandan R. *Pseudomonas* infections in Tohid burn center. *Iran Burns*. 1998; 24: 637- 641.
- 39- Karimi Estahbanati H, Pour Kashani P, Ghanaatpisheh F, et al. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns*. 2002; 28: 340- 348.
- 40- Gerd D, Gerald BP. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*. 2008; 26: 1011-1024.
- 41- Tranb WH and Scheidhauer R. Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 44 (4): 243-259.
- 42- Mastoraki A, Douka E, Kriaras I et al. *Pseudomonas aeruginosa* susceptible only to colistin in intensive care unitpatients. *Surg Infect*. 2008; 9:153-160.
- 43- Cigana C, Lore NI, Bernardini ML, Bragonzi A. Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *J of Biomedicine and Biotechnol*. 2011; Article ID 852513.
- 44- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnostic Microbiology. 11th Ed. Missouri: Mosby Company. 2002; p: 389-391.

- 45- Eberl L and Tummeler B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *J of Med Microbiol.* 2004; 294:123–131.
- 46- Ang JY, Ezike E, Asmar BI. Anti bacterial resistance. *Indian j pediatrics.* 2004; 229-239.
- 47- Richard JF, Mary EH, Wdee T, Quang ND, Victor N, Yitzhak T. Selectively Guanidinylated Aminoglycosides as Antibiotics. *Chem Med Chem.* 2012; 7(7): 1237–1244.
- 48- Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. B-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8:525-533.
- 49- Van EHL and Dubos R. Unearthing antibiotics. *J Exp Med.* 2006; 203(2): 259.
- 50- Leski TA and Alexander T. Role of Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) in the Antibiotic Susceptibility and Cell Wall Cross-Linking of *Staphylococcus aureus* Evidence for the Cooperative Functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. *J Bacteriol.* 2005; 187(5):1815-1824.
- 51- Smith RG. Penicillin and cephalosporin drug allergies: a paradigm shift. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2008; 98: 479-488.
- 52- Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4: 551-500.
- 53- Thomason KS, ListervPD. Other beta- lactamas antibiotics. In: Gorbach SL, Bartlett JG, lacklow NR. Infectious diseases. 3th Ed. Baltimore, Williams and Wilkins. 2004; P: 204 -208.

- 54- Al-Jasser AM. Extended – spectrum beta- lactamase (ESBL): aglobal problem. *Kuwait Med J.* 2006; 38(3): 171-185.
- 55- Fred CT. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American J Med.* 2006; 119 (6): 3–10.
- 56- Murray PR, Drew WI, Kobayash GS, Thompson JH. Medical microbiology. International Student Edition. 1999; p: 103-107.
- 57- Siegel MD, Robert E, Emerging Gram-Negative Antibiotic Resistance: Daunting Challenges, Declining Sensitivities, and Dire Consequences. *Respiratory Care.* 2008; 53: 4.
- 58- Aeschlimann JR. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Society of Infectious. *Pharmacotherapy.* 2003; 23(7):916-924.
- 59- Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ.* 1998; 317:657-660.
- 60- Abigail AS, Dixie D. Revengoof the microbes; how bacterical resistance is under minning the antibiotic miracle. 2005; p: 80-90.
- 61- Barza M. Potential mechanisms of increased disease ishumans from antimicrobial resistance in food animals. *Clin Infeect Dis.* 2002; 34(3): 123–125.
- 62- Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species. *Investing. Drugs.* 2008; 17(2):131-143.
- 63- Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, et al. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(4):827-830.

- 64- Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(11):4783-4788.
- 65- Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital from a rural area. *Indian J Med Res*. 2005; 121:701-703.
- 66- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo-betalactamases: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2):30.
- 67- Koh TH, Babini GS, Woodford N, et al. Carbapenem hydrolyzing IMP-1 beta lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. *Lancet*. 1999; 353: 2162.
- 68- Arya SC, Agarwal N. International Travel with Acquisition of Multi-Drug Resistant Gram Negative Bacteria Containing the New Delhi Metallo-Beta-lactamase Gene, Bla NDM-1. *Travel Med Infect Dis*. 2011; 9(1):47-48.
- 69- Kim Y, Tesar C, Mire J, et al. Structure of Apo- and Monometalated Forms of NDM-1-A Highly Potent Carbapenem-hydrolyzing Metallo- β -lactamase. *PloS One*. 2011; 6(9): 24621.
- 70- Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Al Naiemi N, et al. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54:2420-2424.
- 71- Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, et al. KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; p.4194-4197.

- 72- Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2006; 44 (9): 3139 -3144.
- 73- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S20. CLSI, Wayne, PA. 2010. 40: 2755-2759.
- 74- Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, et al. Evaluation of a new Etest for detection metallo beta lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2755-2759.
- 75- Mihani F, Khosravi A. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo beta lactamases from infections in burned patients and identification of blaIMP and blaVIM genes by PCR. *Iranian J Med Microbiol* 2007; 1(1): 23-31.
- 76- Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo beta lactamases in a Large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3129-3135.
- 77- Ana CG, Liana CM , Suzane S , Hélio S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM Metallo-β-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003; (52): 699–702.
- 78- Park JJ, Oh EJ, Lee S, Kim SI, Park YJ, Kang MW. Prevalence of metallo beta lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo beta lactamase. *J Microbiol Methods* 2003 ;(54):411-418.
- 79- Arunagiri K, Sekar B, Sangeetha G, John J. Detection and Characterization of Metallo-β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* by Phenotypic and Molecular

- Methods from Clinical Samples in a Tertiary Care Hospital. *West Indian Med J.* 2012; 61:778.
- 80- Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPS, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produces by carbapenem-resitant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazillian hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11:73-76.
- 81- Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo beta lactamases in a Large centralized labratory. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:3129-3135.
- 82- Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay MN. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burnwounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns* 2005; 31(6):707-10.
- 83- Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec; 41(12):5407-13.
- 84- Lee MF, Peng CF, Hsu HJ and Chen YH. Molecular characterization of the metallo- β -Lactamase genes in imipenem-resistant Gramnegativebacteria from a university hospital in Southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 32(6): 475-480.
- 85- Camargo CH, Nascimento AB, Mondelli AL, Montelli AC, Sadatsune T. Detection of SPM and IMP metallo- β -lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15(5):478-481.

- 86- Shibata N, Doi Y, Yamane K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(12): 5407-5413.
- 87- Gomes FMR, Caiaffa-Filho HH, Burattin MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university Hospital. *Clin Sci*. 2010; 65:825-829.
- 88- Sadeghi A, Rahimi B, Shojapour M. Molecular detection of metallo- β -lactamase genes BlaVIM-1, blaVIM-2, blaIMP-1, blaIMP-2 and blaSPM-1 in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from hospitalized patients in Markazi province by Duplex-PCR. *African J Microbiol* 2012; 6(12): 2965-2969.
- 89- Imani Fooladi AA, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods, Zanzan, Iran. *Iranian J Med Microbiol*. 2011; 10:189-198.
- 90- Saderi H, Lotfalipour H, Owlia P, Salimi H. Detection of Metallo- β -Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients in Tehran, Iran. 2010; 41:10
- 91- Khosravi AD, Mihani F. Detection of metallo- β - lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60(1): 125-128.
- 92- Shahcheraghi F, Nikbin VS, Shooraj F, et al. characterization of blaVIM1, blaIMP1 and blaSPM metallo- β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Imam Khomaini hospital of Tehran. *Pejouhandeh* 2010; 2(68): 67-72.

- 93- Shakibaie MR, Shahcheraghi F, Hashemi A, Adeli NS. Detection of TEM, SHV And PER type Extended-Spectrum- Lactamase Genes among Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients at Shafa-Hospital, Kerman, Iran. *Iranian J Med Sci*. 2008; 11(2): 49-54.
- 94- Walsh T. The emergence and implications of metallo-betalactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13(1):113.
- 95- Aoki S, Hirakata Y, Kondoh A, et al. Virulence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:1876-78.
- 96- Varaiya A, Kulkarni N, Kulkarni M, Bhalekar P, Dogra J. Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients. *Indian J Med Res*. 2008; 127:398-402.
- 97- Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S. Clinical and Bacteriological characteristics of IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 2003; 37:26-32.
- 98- Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad SH. Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the south of Iran. *Burns*. 2006; 32: 343-347.
- 99- Saderi H, Karimi Z, Owlia P, Bahar A A, Akhavi Rad S M B. Phenotypic Detection of Metallo- beta- lactamase producing *pseudomonas aeruginosa* strain Isolated from Burned patients. *Iran J pathol*. 2008; 3(1): 20-24.
- 100- Mirsalehian A, Feisabadi M, Akbari Nakhjavani F, Jabal ameli F, Goli H. Prevalence of extended spectrum beta lactamases among strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Iranian J Med Sci*. 2008; 66: 333-337.

101-Fazeli H, Moslehi T Z, Irajian GR, Salehi M. Determination of Drug resistance patterns and detection of bla-VIM gene in *Pseudomonas aeruginosa* strains Isolated from burned patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran. *Iranian J Med Sci.* 2008; 4: 3: 1-8.

Abstract

Back ground: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen and one of the most frequent pathogens in nosocomial infections. It causes different types of infections including urinary tract infections and Bacteremiae. This bacterium shows high resistance to majority of antibiotics including β -lactams. The aim of this study was detection of IMP, VIM and SPM Metallo- beta- lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

Method: In this cross-sectional study, 350 *Pseudomonas aeruginosa* isolates were collected from the various clinical specimens in Tehran and Qazvin hospitals from 2011 to 2013. After identification of isolates by biochemical tests, antibiotic susceptibility (Kirby-Baur method) was done according to CLSI advice against 18 antibiotics. The Combined Disk method was then carried out for detection of MBLs and the *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{SPM} genes were determined by PCR.

Results: In this study, cephodoxim and polymyxin with 98.6% and 1.7% resistance showed the highest and lowest resistance against isolates. A total of 350 isolates, 138 (34.9%) isolates were carbapenem- resistant. From 138 isolates, 58 (42.02%) isolates were metallo-beta-lactamase producer which 17 isolates (29.3%) and 13 isolates (19.7%) carried *bla*_{IMP-1} and *bla*_{VIM-1} genes, respectively. Also 3 (5.2%) isolates carried both of the *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} genes simultaneously.

Conclusion: Considering the moderate prevalence and clinical importance of MBL-producing isolates, rapid identification of them and use of the appropriate infection control measures are necessary to prevent further spread of infections by these organisms.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Metallo-Beta-Lactamase, Antibiotic resistance



Qazvin University of Medical Sciences

**Microbiology Department
M.s.c Thesis on Microbiology**

Subject

Evaluation of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* producing Metallo-beta- lactamase IMP, VIM and SPM by PCR

Thesis Supervisor:

Amir Peymani (Ph.D)

Consulating Advisors:

Amir Javadi (Ph.D)

By:

Mahdi Mohammadi